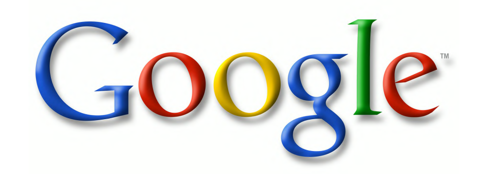


Journal de microbiologie

Institut Pasteur (Paris, France)






VE
RI
TAS

ANNALES
DE L'INSTITUT PASTEUR

ANNALES
DE L'INSTITUT PASTEUR

(JOURNAL DE MICROBIOLOGIE)

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **M. PASTEUR**

ET PUBLIÉES

PAR

M. E. DUCLAUX

MEMBRE DE L'INSTITUT
PROFESSEUR A LA SORBONNE
DIRECTEUR DE L'INSTITUT PASTEUR

Assisté d'un Comité de rédaction composé de

MM. Dr CALMETTE (A.), directeur de l'Institut Pasteur de Lille ;
CHAMBERLAND, chef de service à l'Institut Pasteur ;
Dr GRANCHER, professeur à la Faculté de médecine ;
Dr LAVERAN, membre de l'Institut de France ;
METCHNIKOFF, chef de service à l'Institut Pasteur ;
Dr ROUX, sous-directeur de l'Institut Pasteur ;
Dr VAILLARD, médecin principal de l'armée.

TOME DIX-SEPTIÈME
1903
AVEC DIX-NEUF PLANCHES

PARIS
MASSON ET Cie, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN

17me ANNÉE JANVIER 1903. No 1

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

NOUVELLES RECHERCHES SUR L'ARSENIC DE L'ORGANISME

PRÉSENCE DE CE MÉTALLOIDE DANS LA SÉRIE ANIMALE

PAR M. GABRIEL BERTRAND

A la suite des expériences que j'ai décrites, concernant la recherche de très petites quantités d'arsenic et l'existence normale de ce métalloïde dans l'organisme de plusieurs mammifères[1], il m'a paru nécessaire d'examiner si l'arsenic se rencontre aussi chez les autres animaux, de poursuivre cette recherche jusque chez les types les moins élevés en organisation.

Le problème se pose, en effet, de savoir si l'arsenic est un élément primordial de la cellule vivante, comme le carbone, l'azote, etc., ou bien s'il répond seulement au besoin d'une fonction particulière, apparue à un certain degré de perfectionnement de l'échelle animale.

Pour résoudre ce problème d'une manière satisfaisante et pouvoir tirer des nouvelles recherches tout l'enseignement qu'elles comportent, il était indispensable d'opérer dans des conditions aussi rigoureuses que possible, c'est-à-dire sur des animaux vivant dans un milieu normal, éloigné par conséquent de toutes ces causes de contamination qui résultent du contact plus ou moins direct avec l'industrie actuelle.

Les cétacés, certains oiseaux, des poissons et d'autres animaux qui fréquentent les abîmes de l'Océan présentent à ce point de vue les meilleures garanties. Ce sont eux que j'ai choisis et, grâce à la générosité de S. A. S. le prince de Monaco, ce sont eux que j'ai pu étudier.

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XVI, p. 553-561 (1902).

Toutes les captures, et même une partie des recherches chimiques (destruction des matières organiques, précipitation et mise en liberté du métalloïde) ont été effectuées au cours d'une croisière scientifique entreprise cette année, du 18 juillet au 17 septembre, à bord du yacht *Princesse-Alice*.

A l'exception d'un mouton, qui provient des pâturages du mont Pico, et de l'orque, harponnée par le prince en Méditerranée, les autres matériaux d'études ont été recueillis en plein Atlantique, quelquefois à 1,800 mètres de profondeur, dans une zone comprise entre Gibraltar, les Açores et l'ouverture de la Manche (exactement le banc de la Petite-Sole).

Bien entendu, on a pris les plus grandes précautions pour ne pas souiller les animaux. Les dissections ont été faites sur une table de bois et non, comme on en avait l'habitude à bord, sur des plateaux en zinc. Les pétrels ont été tués au fusil, mais, pour éviter l'erreur que pouvait apporter la présence du plomb de chasse, toujours arsenical, on a rejeté le corps de ces oiseaux et utilisé seulement les plumes, séparées avec soin aussitôt après la mort. Les actinies, les étoiles de mer, les seiches et autres animaux provenant des fonds ont été lavés complètement à l'eau de mer, afin de détacher les dernières particules sableuses qui pouvaient y adhérer. Dans le cas des étoiles de mer et des oursins, plus difficiles à nettoyer à cause des nombreux tentacules et des pointes qui hérissent leur surface, on a prélevé un échantillon du fond sableux sur lequel on les avait dragués, et on y a cherché l'arsenic en opérant comme s'il s'était agi des animaux eux-mêmes.

Cet échantillon, desséché, pesait 38 grammes. Il était formé presque entièrement de squelettes calcaires de globigérines. Attaqué par 73 grammes d'acide nitrique et 65 grammes d'acide sulfurique, il n'a donné qu'une trace douteuse d'arsenic. Les quelques grains qui pouvaient rester après le corps des animaux ne peuvent donc être considérés comme une cause d'erreur.

Il aurait pu en être autrement si on avait eu affaire à certains fonds d'origine volcanique. C'est ainsi que 16 grammes de sable et de petits cailloux, ramenés d'une profondeur de 1,187 mètres, près de l'île São Miguel, ont fourni un anneau arsenical d'environ 4 à 5 millièmes de milligramme. Les actinies, pêchées sur ce fond, dont la nature volcanique était évidente,

ont été fendues et nettoyées minutieusement, de manière à ne plus présenter trace de matières étrangères.

Remarquons qu'il eût fallu un nettoyage vraiment grossier de ces actinies pour y laisser 1 gramme et demi de sable ou petits cailloux correspondant à la plus petite quantité d'arsenic décelable par mon procédé de recherche. De sorte qu'on ne peut, ici non plus, faire valoir la présence de particules venant du fond dans le corps des animaux contre le résultat de l'analyse.

Mais il ne suffisait pas de recueillir et de préparer les échantillons dans des conditions aussi rigoureuses ; il fallait encore pouvoir les conserver et les analyser à l'aide de produits et de réactifs bien exempts d'arsenic.

Chaque fois qu'on n'a pas expérimenté sur des matériaux frais, c'est l'alcool qui a servi d'agent conservateur. On en possédait une provision dont un litre avait permis de vérifier la pureté absolue au point de vue qui nous occupe. Les animaux ou parties d'animaux étaient placés dans environ leur poids de cet alcool, au titre de 96°. Au moment des analyses, on pesait à nouveau le liquide et la partie solide, et on opérait sur un mélange de portions aliquotes.

Quant aux réactifs, ils étaient encore plus purs que ceux employés au cours de mes précédentes recherches. C'est ainsi que 300 grammes d'acide azotique étaient nécessaires pour donner, avec 30 grammes d'acide sulfurique et 25 grammes de zinc, un anneau arsenical de 1/2 millième de milligramme, c'est-à-dire pour atteindre la limite de sensibilité de la méthode, telle que je l'ai modifiée. Dans aucune expérience, d'ailleurs, on n'a employé une aussi grande quantité de réactifs pour rechercher l'arsenic.

Il était avantageux, en effet, au point de vue de la précision, de limiter autant que possible la quantité des réactifs mis en jeu dans chaque expérience. J'ai réalisé cette condition, aussi bien en ce qui concerne l'attaque de la matière organique que la séparation de l'arsenic dans l'appareil de Marsh.

En prenant un mélange de 1 partie d'acide sulfurique avec 9 d'acide azotique, et en ajoutant encore aux organes, suivant les cas, une plus ou moins grande quantité d'acide sulfurique pur, on peut arriver aisément à libérer l'arsenic avec un poids de

réactifs ne dépassant guère 1/2 à 3 fois celui de la matière sèche.

Certains animaux ou organes, riches en composés calcaires, exigent toutefois un supplément d'acide sulfurique, destiné à la transformation du calcium en sulfate.

Si l'on prend, par exemple, comme cela a été le cas le plus fréquent, des tissus mous (thyroïde d'orque, muscle de grondin, testicule de squale, holothurie, etc.), ou même des plumes de pétrel, de la corne de mouton ou de l'écaille de tortue, on procède la manière suivante :

Le tissu, frais ou au sortir de l'alcool, est d'abord divisé en petits fragments à l'aide de ciseaux. S'il y a lieu, le liquide alcoolique dans lequel il était conservé est évaporé à sec au bain-marie ; on opère alors cette évaporation dans la capsule où se fera l'attaque. La corne et l'écaille doivent être réduits en poudre fine dans un mortier, le mieux après dessiccation à l'étuve. L'échantillon ainsi préparé est pesé ; on évalue, soit par un calcul approximatif, soit par chauffage à l'étuve d'une portion aliquote, ce qu'il renferme de matière sèche, et on le met dans une capsule de porcelaine spacieuse avec une quantité du mélange acide correspondant à 1 ou 2 fois le poids de la matière sèche. On ajoute à ce mélange encore un peu d'acide sulfurique, à peu près 20 à 25 0/0 du poids sec, et on chauffe doucement. On peut commencer ce chauffage au bain-marie, surtout si le tissu est imbibé d'alcool, mais il faut le continuer sur un fourneau à gaz ou à pétrole, recouvert d'une toile métallique et d'un large disque de métal, perforé au centre. On peut ainsi pousser le feu à la fin de l'opération, sans courir le risque de surchauffer les bords de la capsule.

Pendant le chauffage, il faut agiter continuellement le mélange en réaction qui doit rester très homogène. La dissolution se fait rapidement ; on obtient une masse visqueuse, jaune clair d'abord, puis jaune foncé, plus fluide, se caramélisant enfin.

En opérant comme je l'indique, c'est-à-dire avec un mélange assez riche en acide sulfurique, on n'a pas à craindre cette espèce de déflagration qui arrive quelquefois dans le procédé habituel de M. Arm. Gautier. La décomposition de la matière organique se poursuit régulièrement jusqu'à la fin. On augmente un peu le feu quand le mélange brunit, et l'on chauffe,

toujours en agitant, jusqu'à ce que la masse soit tout à fait noire et homogène[1]. En général, on n'obtient pas le résultat indiqué du premier coup; il faut rajouter encore du mélange acide et évaporer de nouveau. Quand on a un peu d'habitude, on voit très bien, au cours de l'opération, qu'on n'arrivera pas au but sans une nouvelle addition de réactifs; on verse alors le mélange acide avec une pipette, peu à peu, tout en remuant et en poursuivant l'évaporation. Lorsque l'attaque est terminée, la masse restant dans la capsule ressemble à du cirage[2]; si on en met un peu dans l'eau froide, elle se divise facilement en fines particules et le liquide se colore à peine en jaune.

On éteint le feu, on projette goutte à goutte de l'eau froide sur le résidu noir, puis, à la fin, une plus forte quantité d'eau; 1/4 de litre, par exemple. On délaye bien la masse et, après refroidissement complet, on sépare les produits humiques insolubles par filtration. Le liquide, réuni aux eaux de lavage du précipité, est alors soumis à l'action de l'acide sulfureux et du gaz sulfhydrique, suivant la méthode connue.

Avec les éponges, les astéries, les écailles de poisson, il faut augmenter, au début, la dose additionnelle d'acide sulfurique pur, à cause de leur richesse en combinaisons calcaires.

Les oursins ont été traités avec leurs carapaces de carbonate de calcium; on a donc modifié un peu le début de l'opération, pour ne pas être gêné à la fin par une forte proportion de nitrate, qui aurait provoqué l'inflammatiou du mélange.

Cent grammes d'oursins (sortant de l'alcool) et représentant 26gr,8 de matière sèche, ont été placés dans une capsule avec l'extrait sec, soit 3gr,6, provenant des 110 grammes de liquide dans lequel ils baignaient. On a ajouté peu à peu le mélange acide, en opérant au bain-marie, jusqu'à ce qu'une nouvelle addition ne produisît plus d'effervescence sensible. A ce moment, la craie étant saturée, on avait employé 36 grammes de mélange, soit 32gr,4 (les 9/10) d'acide azotique. Ces 32gr,4 correspondent à peu près à 25 grammes d'acide sulfurique pur; on en a ajouté 30 : tout le calcium qui se trouvait sous forme de nitrate s'est transformé en sulfate, de sorte que le contenu de la cap-

1. Avec l'éponge, les écailles de poissons, elle était sèche et pulvérulente.
2. La plus haute température qu'on doive atteindre est celle à laquelle commencent à se dégager quelques vapeurs blanches (vapeurs d'acides gras principalement).

sule renfermait finalement 32^{gr},4 d'acide zoatique et 5 + 3,6, = 8^{gr},6 d'acide sulfurique. L'attaque a été terminée comme les précédentes.

Je suis parvenu aussi à limiter beaucoup le poids des réactifs, zinc et acide sulfuriqne, nécessaires à la conduite de l'appareil de Marsh. Le poids de zinc, platiné d'avance et lavé, est de 15 à 20 grammes par opération. Sur ce poids, il ne s'en dissout guère que 2 1/2 à 3 grammes. La quantité d'acide sulfurique dépasse rarement 6 grammes. J'en verse d'abord 2 étendus au 1/5, pour chasser l'acide carbonique. Après un quart d'heure et derrière la solution arsenicale, j'en ajoute un troisième, dilué de 9 parties d'eau ; puis, après 1/2 heure environ, je fais une seconde addition d'un gramme au 1/0 : enfin, après 1 heure, 2 grammes d'acide au 1/5 complètent et même au delà la dose exigée pour le dégagement de tout l'arsenic à l'état d'hydrure.

L'acide est toujours versé par l'intermédiaire d'un entonnoir à robinet, de manière à pouvoir régler le dégagement gazeux. Au commencement, lorsqu'on déplace l'acide carbonique, on cherche à gagner du temps et l'on verse presque d'un seul coup la première dose d'acide; mais à partir du moment où la solution arsenicale pénètre dans l'appareil, il faut régler la vitesse de production de l'hydrogène entre 4 et 10 c. c. au plus par minute.

Les expériences d'isolement de l'arsenic que j'ai faites pendant la croisière ont surtout servi à m'orienter au milieu de mes recherches. Malgré une installation vraiment remarquable, on ne pouvait compter, en effet, travailler sur le navire comme dans un laboratoire. Le climat chaud et humide, le mouvement du roulis rendaient les manipulations très fatigantes, quelquefois même impossibles. Les opérations de pêche et de chasse, indispensables pour se procurer les matériaux d'études, causaient à leur tour de nouvelles interruptions. Enfin, les attaques de matières organiques étant effectuées sur le pont, il était impossible, malgré les dispositions prises, d'éviter tout à fait l'influence du vent; l'entraînement des gaz chauds et quelques extinctions portaient la durée d'une attaque à 2 ou 3 heures, pendant lesquelles il fallait toujours craindre l'introduction de poussières, notamment celles de la cheminée, dans le mélange en réaction. Pour ces diverses causes, on n'a exécuté, durant la croisière, qu'un nombre assez restreint d'expériences

qui, toutes, ont été reproduites au retour, à l'Institut Pasteur. Les unes comme les autres ont donné d'ailleurs les mêmes résultats.

Les animaux sur lesquels ont porté les recherches ont été les suivants :

Éponge (*Desmacidon fruticosa* [Montagut], Bowerbank)[1]. Les individus de cette espèce, du type corné, viennent du banc de la Petite Sole (9°4 long. ouest. et 48°4 lat. nord), à 150 mètres de profondeur. On les a lavés complètement à l'eau de mer, passés dans l'eau douce et fortement pressés à la main. A cet état, ils pesaient 1,365 grammes et renfermaient 8,90 0/0 de matière sèche.

Actinie (*Chitonactis Richardi*, Marion). Deux individus pêchés à 1,187 mètres, près de l'île São Miguel. Poids : 105 grammes; matière sèche : 12,48 0/0.

Étoile de mer (*Pedicellaster sexradiatus*, Perrier)[2]. Nombreux individus ramenés de 1805 mètres de profondeur avec le chalut, au voisinage de l'île Terceira. Matière sèche : 24,16 0/0.

Oursin (*Strongylocentrotus Dröbachiensis*, Agassiz). Proviennent aussi en grand nombre de la même station que les étoiles de mer. La matière sèche n'a pas été dosée par rapport aux animaux frais.

Holothurie (*Stichopus regalis*, Cuvier) du banc de la Petite-Sole. Matière sèche : 4,62 0/0.

Anatifes (*Lepas anatifera*, Linné). Développés sur une pièce de bois équarrie, flottant au voisinage du banc Chauser (43° lat. nord et 31°5 long. O). On a utilisé seulement les parties molles (pieds, cirrhes, etc.), dans lesquelles on a dosé 10,99 0/0 de matière sèche.

Seiches (*Sepia officinalis*, Linné). Ramenées dans le chalut en même temps que les holothuries. Elles étaient de petite taille. 14 individus, lavés et égouttés, pesaient 813 grammes. On y a dosé 35 grammes d'os et 134gr,6 de matière sèche.

Roussettes (*Scyllium canicula*, Cuvier). Pêchées au banc de la Petite-Sole. Après un lavage soigné, on a enlevé les peaux qui seules ont été conservées dans l'alcool et analysées. Elles contenaient 50,4 0/0 de matière sèche.

1. Détermination de M. Topsent.
2. Presque toutes ces espèces ont été déterminées par M. Jules Richard.

Germons (*Thunnus alalonga*, Gmelin). Pris à la ligne de traîne, en plein Atlantique. On a prélevé 135 grammes de peau sur deux poissons de 4 à 5 kilogrammes chacun.

Serrans (*Serranus atricauda*, Günther). Pêchés sur le banc Guettysburg. On avait mis à part des écailles, de la peau entière et des muscles. Matière sèche dans la peau : 44,4 0/0; dans les muscles : 34,2 0/0.

Grondins (*Trigla pini*, Bloch). Pris au chalut sur le banc de la Petite-Sole. On a séparé la peau de 30 individus et conservé aussi une certaine quantité de muscles. Matière sèche dans la peau : 42,4 0/0; dans les muscles : 22,6.

Squale (*Ceutrocynurus cœlolepis*, Boc.). Pris au palancre, à 1095 mètres de profondeur, au nord de l'île São Jorge. Les testicules frais pesaient 105 grammes; matière sèche : 12,5 0/0.

Tortue de mer (*Thalassochelys caretta*, Linné). Capturée au large des Açores. La carapace a été mise à part. En s'aidant de la scie, de la pince et du pilon, on a séparé les écailles du squelette et on les a réduites en poudre pour l'analyse.

Pétrels (*Procellaria pelagica*, Linné). Neuf de ces oiseaux tirés en haute mer ont fourni 34 grammes de plumes, y compris les becs et les ongles.

Orque (*Orca gladiator*, Linné). Capturée en Méditerranée, près de Gibraltar. Les glandes thyroïdes fraîches pesaient 195 grammes. On n'a fait qu'une seule expérience sur 50 grammes. La peau a été examinée au laboratoire, sur des échantillons conservés dans l'alcool. On avait mis à part une partie de l'épiderme.

Mouton (*Ovis aries*, Linné). Provient des pâturages du mont Pico, à 1500 mètres d'altitude. Il s'était tué en tombant dans une crevasse. On a étudié seulement les cornes, séparées de leur partie osseuse et pulvérisées au mortier.

Le tableau ci-après résume les résultats obtenus.

Comme on le voit par ces résultats, tous les animaux examinés, depuis les vertébrés supérieurs jusqu'aux spongiaires, renferment de petites quantités d'arsenic.

La présence de ce métalloïde n'est pas, comme celle d'autres éléments, en quelque sorte caractéristique de certains groupes d'êtres. Tandis que l'acte respiratoire, par exemple, s'accomplit avec le concours du cuivre chez des crustacés et des mollusques,

Noms des espèces.	Organes examinés.	Poids de matière sèche soumis à l'expérience.	Poids des acides employés dans l'attaque azotique	sulfurique	Arsenic trouvé en milligrammes.
Eponge	entière	36.7	67.5	17,5	0.005
Actinie	entière	13.1	18	7	0.002
Etoile de mer.	entière	29.0	40.5	19.5	0.002
Oursin	entière	30.4	32.5	33.5	0.0045
Holothurie....	entière	81.8	72	15	0.003
Anatife	moins les valves calcaires	31.5	147	26	0,002
Seiche........	moins l'os	40.8	81	14	0,002
Squale........	testicules	12.5	16	7	0,0015
Roussette.....	peau	24.7	45	15	0.0025 à 0,003
Germon	peau	26.0	180	40	0.0035 à 0.004
Grondin	peau	32.7	36	14	0.005
—	muscle	30.1	71	14	0.0015
Serran........	peau	22.2	45	12	0.001
—	muscle	17.1	33	8	0,001
—	écailles	environ 20	»	»	0.001
Tortue de mer.	écailles	20	40.5	9.5	0,0035
Pétrel.........	plumes	34	43	15	0,0025
Orque	corne	50 (à l'état frais)	45	10	0.0025
—	épiderme	40	86.5	19.5	0,0035
—	peau	14.4	36	9	0,002
Mouton.......	glande thyroïde.	20	50.5	10.5	0,004

avec celui du fer chez les vertébrés, la différenciation morphologique et fonctionnelle s'est poursuivie d'un bout à l'autre de l'échelle animale, sans s'accompagner, en ce qui concerne l'arsenic, d'aucune différenciation chimique élémentaire.

Il ressort, en outre, des résultats que je viens de publier et de ceux que j'ai communiqués antérieurement, qu'au lieu d'être localisé dans certains organes, l'arsenic se retrouve au contraire dans tous les tissus.

On sait qu'à l'aide de sa méthode de recherche, M. Arm. Gautier était arrivé à la conviction que la glande thyroïde est l'organe le plus riche en arsenic, celui qui renferme, pour ainsi dire, la provision arsenicale de l'individu. M. Arm. Gautier avait trouvé aussi une quantité notable d'arsenic dans la glande mammaire, beaucoup moins dans le cerveau et le thymus, enfin des traces seulement dans la peau et ses annexes (par exemple, un peu moins de 1/20e de milligramme dans 150 grammes de corne de bœuf). M. Arm. Gautier n'a pu en déceler, par contre, ni dans le foie, ni dans les muscles, ni dans les testicules[1]. Ma méthode, environ dix fois plus sensible et en même temps plus

1. *Comptes rendus Ac. d. Sciences*, t. CXXX, p. 284-291, 1900.

précise [1], montre que ces derniers tissus renferment eux-mêmes une certaine proportion du métalloïde [2].

Ainsi, l'arsenic existerait dans toutes les cellules vivantes ; il serait, au même titre que le carbone, l'azote, le soufre ou le phosphore, un élément fondamental du protoplasma [3].

Cette conclusion comporte des conséquences importantes. La nature et les transformations réciproques des combinaisons arsenicales de l'organisme devront maintenant préoccuper les chimistes; leur rôle à l'état de santé et de maladie devra faire l'ojet de nouvelles études de la part des physiologistes et des médecins. La thérapeutique et jusqu'à l'agriculture devront ressentir l'utile contre-coup des résultats acquis dans ces directions. Enfin, la médecine légale voit s'éclairer un des points les plus obscurs de son domaine, celui sur lequel ont eu lieu le plus de discussions.

M. Arm. Gautier a établi, comme on l'a vu plus haut, qu'une petite quantité d'arsenic existe, chez l'homme, dans la glande thyroïde, qu'il y en a aussi des traces dans le cerveau, dans la peau et ses annexes [4]. Cette découverte, contredite par divers savants [5], se trouve aujourd'hui non seulement appuyée par des faits d'une signification très générale, mais encore étendue à tous les tissus de l'économie. On peut dire que de petites quantités d'arsenic isolées du corps, même du tube digestif, du foie ou des muscles, peuvent avoir une origine exclusivement normale. On devra donc toujours, soit au cas de recherches sur la diffusion ou la répartition de l'arsenic, entreprises dans un but médical ou autres, soit au cas d'expertises médico-légales, baser les conclusions sur des dosages du métalloïde, et non pas, comme on l'a malheureusement fait dans quelques circonstances, se contenter de simples recherches qualitatives.

1. Une description détaillée de cette méthode paraîtra prochainement dans les *Annales de Chimie et de Physique*.

2. A ce sujet, il est intéressant de remarquer que l'éponge, supprimée de la thérapeutique moderne, mais qui servait autrefois à combattre diverses affections, et notamment le goitre, trouve une nouvelle justification de son emploi dans les résultats exprimés plus haut. Non seulement, en effet, l'éponge contient de l'iode en quantité importante, mais encore cet autre principe essentiel de la glande thyroïde, l'arsenic, dans une proportion qui n'est atteinte par aucun autre animal.

3. Les animaux se nourrissant tous, directement ou indirectement, de végétaux, ces derniers doivent renfermer de l'arsenic.

4. *Loc. cit.*

5. Hodlmoser, *Zeitsch. f. physiol. Chem.*, 1901, t. XXXIII, p. 329-344 ; Ziemke, *Apotheker Zeitung*, 1902, t. XVII, et Cerny, *Zeitsch. f. physiol. Chem.*, 1902, p. 408-416.

QUELQUES NOUVELLES RACES DE LEVURES DE LACTOSE

PAR P. MAZÉ

Le lactose a été rangé pendant longtemps parmi les sucres susceptibles de se dédoubler en alcool et acide carbonique sous l'influence des levures ; mais une étude approfondie des propriétés des levures ordinaires a conduit peu à peu à cette conclusion que le lactose était réfractaire à leur action. Partout où on avait cru observer une fermentation alcoolique du lactose, on n'aurait dû relever qu'une fermentation de ses composants, le glucose et le galactose, mis en liberté par la lactase sécrétée par des microbes qui se développent à côté des levures.

M. Duclaux [1] a rencontré, le premier, une levure de lactose dans un lait qui fermentait comme du moût ensemencé avec des saccharomyces. Plus tard, M. Adametz [2], d'abord, et M. Kayser [3], ensuite, en ont découvert deux autres jouissant également de la propriété de faire fermenter le lactose. Ces trois levures ont été l'objet d'études suivies.

Quelques auteurs en ont signalé d'autres, en particulier, MM. Weigmam [4], Boccichio [5], Jorgensen [6], Freudenreich et Jensen [7]; elles ont été rencontrées dans le fromage, l'*aisy* ou le beurre; mais elles n'ont pas été identifiées avec les 3 précédentes, et l'on se demande même si elles étaient toutes de véritables levures de lactose [8].

Le milieu qui semble le mieux qualifié pour héberger de pareilles levures est certainement le lait ; mais si on essaye de les y découvrir, on remarque tout de suite qu'en fait de *saccharomyces*, on n'y rencontre que des levures ordinaires. Ce résultat s'explique de lui-même; les levures ordinaires passent inaper-

1. *Ces Annales*, t. I, p. 573.
2. *Centralb. f. Bakt.* 1889, t. V, p. 116.
3. *Ces Annales*, t. V, 1891, p. 395.
4. *Milchzeitung*, 1890, n° 38, p. 743.
5. *Annales de Micrographie*, t. VI, 1894.
6. *Mikroorg. d. Gahrungsind.* 1898.
7. *Centralblatt für Bakt.*, 1897, 2e, p. 552, et O. Jensen, *Annuaire agricole de la Suisse*. 1901, 9e fasc., p. 344.
8. La *torula amara* isolé, par M. Harrisson, du lait amer est également un ferment alcoolique du lactose. *Revue générale du lait*, n° 20, p. 457.

çues dans le lait, tandis que celles qui sont capables de faire fermenter le lactose se signalent par un dégagement abondant d'acide carbonique et par un changement rapide dans la saveur du lait, très sensibles déjà avant 48 heures de conservation. On s'applique donc à les éliminer dès qu'elles révèlent leur présence, et comme leur destruction est chose facile, on ne les rencontre qu'accidentellement dans le lait, et en conséquence dans le beurre.

Pour les trouver, il faut s'adresser à des fromages à pâte molle, parce que ceux-ci ne subissent qu'un chauffage très modéré au moment de l'emprésurage, incapable par conséquent de tuer les germes que le lait peut rencontrer dans les fromageries; et si le lait ne s'ensemence pas spontanément avant l'emprésurage, les fromages égouttés sont susceptibles de servir de réceptacles aux levures de lactose, en raison de leur consistance, qui n'offre aucune barrière à la pénétration de celles qui sont répandues sur les appareils de la fromagerie.

Comme j'ai eu l'occasion d'étudier la flore microbienne d'un certain nombre de variétés de fromages, je me suis attaché à vérifier si le monde des levures de lactose n'est pas, en réalité, plus peuplé que ne l'indiquent les renseignements qu'on possède, jusqu'à présent, sur lui.

L'expérience a montré, tout de suite, que cette supposition est justifiée. J'ai isolé, avec le concours de MM. Perrier et Guérault, 11 espèces différentes de levures de lactose tirées de diverses variétés de fromages.

Voici les fromages que j'ai examinés avec le nombre de levures de lactose que j'en ai retirées.

TABLEAU I

Fromages.	Nombre de levures.	Nos
Camembert.	2	1-2
Brie.	0	»
Coulommiers (double crème).	2	3-4
Port-du-Salut.	1	5
Pont-l'Évêque.	1	6
Bonde de Neufchâtel.	1	7
Munster.	2	8-9
Livarot.	1	10
Emmenthal.	0	»
Mont-d'Or.	1	11
Saint-Nectaire.	0	»
Tome de Savoie.	0	»
Reblochon.	0	»

A côté de ces levures, il y a partout des levures ordinaires, sauf dans l'Emmenthal; comme je n'ai examiné qu'un seul échantillon de chaque variété de fromage, les renseignements du tableau précédent ne sauraient être invoqués en faveur de la présence constante ou de l'absence complète des levures de lactose dans une variété donnée de fromage; ce qui le prouve, c'est que M. Perrier, en examinant un deuxième échantillon de Brie, en a trouvé une autre que je ne fais pas figurer ici.

Ces levures ne tiennent pas une grande place dans la flore des fromages. Pour les mettre en évidence, j'ai ensemencé de petits fragments de pâte, de la grosseur d'une tête d'épingle, dans un bouillon organique légèrement acidulé et additionné de saccharose qui s'intervertissait par la stérilisation.

Dans ce milieu, ce sont les ferments lactiques qui se développent les premiers; puis les moisissures, les mycodermes, les oïdiums apparaissent et ne tardent pas à provoquer un léger dégagement de gaz.

La levure, moins prolifique, ou plus difficile à rajeunir, ne se montre en abondance que bien plus tard, et quelquefois on est obligé de faire un deuxième passage dans le même milieu en prenant la semence au fond du tube où les rares globules présents se réunissent de préférence. La prise de possession du milieu se signale par une fermentation active, laquelle se révèle au moindre choc imprimé aux tubes par une effervescence tumultueuse.

C'est à ce moment qu'on isole sur gélose, et toutes les espèces de levures ou de formes-levures obtenues sont ensemencées directement dans le lait. Celui-ci devient le siège d'une fermentation active au bout de 48 heures si la levure ensemencée fait fermenter le lactose.

Pour mettre en évidence les caractères distinctifs de ces levures, j'ai utilisé un milieu formé de parties égales de bouillon Martin et d'une solution de lactose additionné de 1 0/00 de phosphate d'ammoniaque.

On alcalinise avec du carbonate de sodium ou on acidifie avec de l'acide lactique, suivant les observations que l'on se propose de faire.

Le choix de ce milieu se justifie par les raisons suivantes : d'abord on ne peut songer à un milieu minéral, lorsqu'il s'agit

d'échelonner le plus possible les propriétés physiologiques de 11 levures.

Parmi les milieux organiques, c'est le petit-lait qui est tout désigné; on peut se le procurer facilement ou, à la rigueur, le préparer soi-même; mais rien ne prouve qu'il soit le meilleur, car la plupart des levures isolées proviennent de fromages où elles trouvent non seulement de la caséine mais encore une grande quantité de ses produits de dégradation, jusque, et y compris l'ammoniaque; de plus, on n'est jamais sûr d'avance de le rencontrer dans le commerce absolument exempt de lactose interverti, car la plupart des manipulations auxquelles on le soumet, dans un but de conservation, tendent à dédoubler le lactose en raison de la présence d'acide lactique. La présence de glucose ou de galactose libres est un inconvénient sérieux, parce que ces sucres favorisent la multiplication de la levure, et peuvent la rendre capable d'agir sur le lactose en vertu d'une action de masse.

Avec le bouillon Martin, préparé de façon à éliminer aussi bien que possible de la viande le glycogène et ses dérivés, on ne se heurte pas à la même difficulté, et si l'on remarque qu'il est très riche en matières azotées solubles, au nombre desquelles les levures trouveront la plupart des composés qu'elles rencontrent dans la caséine plus ou moins complètement digérée, on peut admettre que, modifié comme je l'ai indiqué, il réunit les meilleures conditions propres à faciliter l'étude que je me propose de faire.

Le milieu ainsi obtenu est stérilisé par filtration à travers une bougie Chamberland, afin d'éviter toute trace d'interversion du lactose.

Additionné de 10 0/0 de lactose commercial pur, exempt de lactose interverti et renfermant un peu plus de 90 0/0 de lactose, il a servi à faire 2 essais de fermentation; l'un en milieu alcalin, l'autre en milieu acide. Le taux de l'alcalinité, évalué en NaOH, est 0,3 0/00; l'acidité obtenue par addition d'acide lactique est de 0,773 0/00. La réaction est évaluée au tournesol d'orcine. Les cultures ont été faites dans des fioles de 150 c. c. qui recevaient chacune environ 100 c. c. de bouillon.

Les résultats obtenus sont résumés dans les 2 tableaux suivants.

TABLEAU II

MILIEU ACIDE

Levures	Etat de la fermentation.	Acidité totale 0/00 en SO^4H^2.	Alcool 0/0 en volume.
—	—	—	—
1	finie	1,260	4,625
2	—	1,349	4,93
3	—	1,205	4,93
4	inachevée	1,101	3,33
5	finie	1,550	4,58
6	—	1,091	4,30
7	—	1,406	4,5
8	—	1,473	3,44
9	—	1,091	2,50
10	inachevée	1,359	4,30
11	—	1,244	3,88
a [1]	—	1,091	4,375
b	finie	1,241	4,44
c	inachevée	1,397	3,66

TABLEAU III

MILIEU ALCALIN

1	»	»	»
2	finie	0,680	4,55
3	—	0,765	4,562
4	—	0,861	4,25
5	—	0,861	4,625
6	—	0,688	4,75
7	—	0,785	4,437
8	—	0,918	4,375
9	—	1,014	3,666
10	—	0,669	4,50
11	—	0,851	4,1

La durée des expériences en milieu acide est de 11 jours à 26°; en milieu alcalin, les levures sont restées d'abord 6 jours à la température du laboratoire, 18-20°, et 6 jours à 26° ; on voit donc que la fermentation est plus rapide dans les milieux alcalins, puisqu'elle est achevée partout en 12 jours, tandis que dans les milieux acides elle n'est pas terminée complètement en 11 jours avec un certain nombre de levures. Ceci semble indiquer que les levures de lactose, habituées à un milieu qui ne tarde pas à

1. Les levures *a*, *b*, *c*, désignent respectivement les levures : Duclaux, Adametz, Kayser.

devenir alcalin, préfèrent les milieux alcalins, ainsi que le prouvent d'ailleurs une production plus grande d'acidité et un rendement en alcool en général plus élevé.

Les levures *a*, *b*, *c* se sont montrées également très actives, plus actives dans ce milieu que dans ceux que les auteurs leur avaient offerts, et l'on voit ainsi que, d'une manière générale, toutes ces levures de lactose présentent les mêmes caractères, en ce qui concerne la production d'acides et d'alcool surtout en milieu alcalin.

Mais quelques-unes semblent se rapprocher du rendement théorique, ce qui veut dire que la quantité de lactose fournie est un peu faible; il est probable que beaucoup d'entre elles sont capables de pousser plus loin l'enrichissement du milieu en alcool, si on leur offre une plus grande quantité de lactose; c'est un moyen d'exagérer les caractères distinctifs de ces levures, et suivant les indications des tableaux II et III, on réussira encore mieux dans cette voie en leur fournissant un milieu acide.

J'ai donc repris ces essais; l'acidité au départ était de 0,8 0/00, le bouillon a été réparti dans des fioles de 250 c. c. à raison de 150 c. c. par fiole; il renfermait 15 0/0 de lactose commercial, en réalité, 13,5 à 14 0/0 de lactose pur. La semence a été empruntée à des fermentations en pleine activité, dans le même milieu acidulé à 2 0/00; chaque fiole a reçu 1 c. c. de semence.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau IV.

TABLEAU IV

Levures.	Durée et état de la fermentation.		Acidité totale en SO^4H^2.	Alcool 0/0 en volume.	Observations.
1	14 jours;	achevée	1,118	7,875	Les cultures ont été arrêtées à mesure qu'on constatait la fin de la fermentation, les levures 5 et *b* seules présentaient encore une très légère fermentation.
2	11	—	1,201	5,25	
3	11	—	1,305	4,25	
4	11	—	1,159	4,	
5	16	inachevée	1,387	5,44	
6	11	achevée	1,066	5,	
7	11	—	1,118	3,775	
8	13	—	1,097	4,375	
9	10	—	1,097	3,	
10	11	—	1,284	5,06	
11	11	—	1,190	4,775	
a	11	—	1,263	4,875	
b	16	inachevée	1,408	6,142	
c	14	achevée	1,263	4,56	

Les chiffres qui expriment la teneur en alcool des liquides de cultures varient du simple au double ; on voit ainsi les différences entre ces diverses levures s'accentuer de plus en plus ; 2 levures ont produit moins d'alcool en milieu riche en lactose qu'en milieu à 10 0/0 : ce sont les levures 3 et 7 ; cela résulte de la comparaison des chiffres des tableaux II et IV ; les autres en fournissent davantage.

***

Mais la comparaison de ces chiffres, considérés tels quels, ne nous donne pas une notion bien nette de l'activité de ces diverses levures ; les quantités d'alcool trouvées ont été produites en effet par des poids variables de levures ; on aura donc des renseignements plus exacts sur cette activité, en ramenant les quantités d'alcool obtenu à l'unité de poids de levure ; cependant, il ne faut pas accorder non plus à ces chiffres ainsi calculés plus de valeur qu'ils ne sauraient avoir. L'activité d'une levure se mesure par la quantité de zymase qu'elle peut mettre en jeu ; cette zymase se conserve ou se détruit sous une foule d'influences qui sont loin d'être identiques d'une levure à l'autre, d'une culture à l'autre.

Le tableau V renferme les éléments des calculs en question et les résultats qu'ils ont fourni. La colonne intitulée *pouvoir ferment*, expression employée comme on voit dans un sens particulier, renferme le poids d'alcool fourni par l'unité de poids de levure.

TABLEAU V

Levures.	Poids de levure calculé 0/0 c. c. de liquide de culture. mgr.	Alcool en poids dans 100 c. c. de liquide de culture. mgr.	Pouvoir ferment.
1	130,6	4700	35,9
2	296,6	4200	14,1
3	189.	3400	17,9
4	196.7	3200	16.2
5	148,2	4352	29.3
6	238,6	4000	16,7
7	265,4	3020	11,3
8	184,4	3500	19,
9	196,7	2400	12,2
10	272,5	4050	14,8
11	250,2	3820	15,2
a	111,5	4913	34,9
b	151,9	3900	32,3
c	»	3648	»

Le pouvoir ferment, défini de la sorte, n'est pas, comme on peut s'en rendre compte, bien élevé chez les levures de lactose; mais par contre, le poids de levure récolté est assez élevé ; cela tient à la nature du bouillon, et aussi à la lenteur de la fermentation qui permet une aération relative du milieu de culture, pendant toute la durée des expériences.

J'ai déterminé en outre, dans les liquides fermentés, la nature et la quantité des sucres restants ; j'ai employé pour cela la méthode ordinaire, basée sur la recherche des pouvoirs rotatoires et réducteurs des solutions avant et après interversion ; le lactose, on le sait, est plus résistant que ses isomères à l'action des acides dilués. Pour obtenir une interversion complète, j'ai traité les liqueurs par 1,5 0/0, en volume, d'acide chlohydrique concentré, à la température de 120° pendant 3 heures, après avoir vérifié préalablement que des solutions à 10 0/0 de lactose étaient complètement interverties dans ces conditions.

Le tableau VI résume les résultats observés.

TABLEAU VI

SUCRES RESTANTS DANS LES LIQUIDES FERMENTÉS

Levures.	Lactose 0/0.	Glucose 0/0.	Galactose 0/0.
1	2,378	0,596	0,474
2	1,974	0,913	1,300
3	2,313	2,95	0,276
4	6,046	0,61	0
5	2,343	0,77	0,168
6	2,476	2,06	0,369
7	5,541	1,07	0
8	3,709	1,490	0,159
9	4,211	2,948	0,569
10	4,480	0,565	0
11	4,457	0,68	0
a	1,974	0,24	0,096
b	3,463	1,050	0
c	3,431	0,932	0,776

On peut déduire de ces chiffres que toutes les levures étudiées préfèrent le galactose au glucose, à l'exception du n° 2 ; cela prouve qu'elles sont bien adaptées à la fermentation du lactose.

On peut prévoir, en outre, qu'elles ne laissent diffuser à travers leur membrane cellulosique que des quantités

négligeables de lactase, puisqu'il y a partout du lactose non dédoublé.

Cependant, les proportions de lactose interverti au lactose varient dans des limites assez étendues; ce fait s'explique par un manque d'équilibre entre les actions respectives de la lactase et de la zymase; l'excès de lactose dédoublé se diffuse dans le liquide de culture; mais ceci n'est qu'une hypothèse; et il se peut que la lactase soit plus ou moins diffusible.

J'ai recherché cette diastase dans les liquides de culture, mais en limitant mes investigations à 3 levures seulement; il est évident en effet qu'il est inutile de rechercher la présence de lactase dans les cultures des levures 4, 7, 10, 11 et *b*, puisqu'elles ne renferment pas de galactose libre. Parmi les autres il y a également un choix à faire; là où le lactose atteint un taux élevé, on ne saurait non plus en trouver; les recherches se limitent ainsi aux levures 1, 2, *a* et *c* qui renferment peu de lactose relativement, et une proportion convenable de glucose et de galactose.

J'ai donc fait agir les liquides de culture sur des solutions de lactose à 10 ou 12 0/0 environ. On mélangeait 2 volumes de liquide de culture à 1 volume de solution de lactose à 25 ou 35 0/0, et on filtrait le mélange à travers une bougie Chamberland, de façon à obtenir un liquide stérile. On recueillait le liquide dans des fioles stériles, et on l'exposait pendant plusieurs jours à la température de 45°; les flacons étaient bouchés, afin d'éviter les pertes de liquide par évaporation. La recherche de la lactase a été faite dans les cultures âgées de 5 jours et de 11 jours, c'est-à-dire au moment où elles étaient en pleine activité et à la fin de la fermentation.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau suivant:

TABLEAU VII

CULTURES EN PLEINE FERMENTATION

Lev.	Durée d'action.	Avant.		Après.		Différences.	
		Rotation.	Réduction.	Rotation.	Réduction.	Rotation.	Réduction.
2	47 heures	13°18′ à 20°	6,2 c.c.	13°28′ à 19°	6,05 c.c.	+ 10′	+ 0,15 c.c.
a)	46 —	7°42′ à —	10,1	7°41′ à 20°	10,15	+ 1′	+ 0,05
c)	41 —	7°32′ à —	10,3	7°34′ à 19°	10,3	+ 2′	+ 0,0

CULTURES A LA FIN DE LA FERMENTATION

2	42 heures	11°57′ à 21° 6,8	12°14′ à 19° 6,6	+ 16′	+ 0,20
a)	—	11°46′ à — 6,8	11°58′ à — 6,65	+ 12′	+ 0,15
c)	—	11°26′ à — 6,85	11°50′ à — 6,55	+ 24′	+ 0,30

Le pouvoir réducteur est exprimé par le nombre de c. c. des solutions de lactose diluées au 1/10, qui décolorent 10 c. c. de liqueur de Fehling dont le titre évalué en glucose est 5,47.

On voit que les levures *a* et *c* ne laissent pas diffuser la lactase pendant qu'elles sont encore jeunes, tandis que la levure 2 en abandonne une petite quantité dans le milieu ambiant; quand la fermentation est achevée, on en trouve également dans les cultures de *a* et *c*; ceci prouve que les cellules âgées en mettent en liberté probablement par voie d'autophagie; la diastase recueillie de cette façon est cependant très peu abondante, et pour obtenir des quantités utilisables de lactase, il faudrait avec ces levures, comme toujours, avoir recours à un broyage. Je dois ajouter, cependant, qu'en réalité il y avait probablement un peu plus de diastase dans le liquide de culture, car le filtre en a retenu une certaine fraction.

Les liqueurs qui ont servi aux essais relatés au tableau VII ont été maintenues encore pendant 52 heures à la température de 45°, l'interversion n'a fait aucun progrès; la diastase avait déjà été détruite par un séjour de 42 heures à 45°. Ce résultat montre que l'influence de l'acidité sur l'interversion du lactose est nulle, dans les conditions où je me suis placé.

Si on détermine, d'après les données du tableau VII, les quantités de lactose interverti, on obtient les chiffres suivants :

	Par la Réduction.	Par la Rotation.
	gr.	gr.
Levure 2 culture en pleine activité	0,7	0,5
2 à la fin de la fermentation	0,58	0,57
a) —	1,170	1,14
c) —	0,78	0,76

Il nous reste maintenant à voir quel crédit on peut accorder aux chiffres du tableau V, car le bouillon, indépendamment du sucre qu'on y a introduit, a une action sur la lumière polarisée; le développement de la levure qui absorbe ou détruit, ou modifie les substances actives, produit une perturbation que l'on ne peut pas évaluer, et que l'on met, à tort, à l'actif des sucres;

l'acide à haute température agit également sur elles; cette dernière correction a été effectuée sur un bouillon privé de lactose; mais elle ne saurait être qu'approximative; il résulte de ces considérations que les chiffres en question ne traduisent pas d'une façon rigoureuse la composition du mélange de sucres qu'ils tendent à fixer.

S'il n'est pas possible de dissiper cette indétermination, on peut du moins fixer jusqu'à quelle limite ils sont acceptables. Si la liqueur soumise à l'interversion n'avait renfermé que du lactose, le rapport des pouvoirs rotatoires après et avant l'action de l'acide eût été 1,33, celui des pouvoirs réducteurs 1,44; mais il y avait en présence du lactose, des proportions variables de dextrosc et de galactose; ces deux derniers sucres n'ont subi aucune modification pendant l'inversion, les rapports visés se déduisent donc de l'expression suivante :

$$\frac{1{,}0526 \times \frac{x}{2}\,(\text{dextrose} + \text{galactose}) + y\ \text{dextrose} + z\ \text{galactose})}{x\ \text{lactose} + (y\ \text{dextrose} + z\ \text{galactose})}$$

On voit immédiatement que la valeur de ce rapport ne peut pas être supérieure à 1,33 si l'on envisage les pouvoirs rotatoires, ou à 1,44 si on considère les pouvoirs réducteurs.

Les éléments de calcul qui ont servi à déterminer la composition du mélange de sucres restants, tableau VI, permettent également d'établir les valeurs correspondantes des rapports des pouvoirs rotatoires ou réducteurs après et avant l'inversion. Je les ai réunis dans le tableau ci-dessous.

TABLEAU VIII

Levures.	Rapport des pouvoirs rotatoires.	Rapports des pouvoirs réducteurs.
1	1,22	1,27
2	1,20	1,17
3	1,40	1,32
4	1,40	1,38
5	1,24	1,25
6	1,29	1,18
7	1,37	1,32
8	1,37	1,27
9	1,21	1,20
10	1,24	1,37
11	1,35	1,36
a	1,27	1,29
b	1,27	1,30
c	1,24	1,26

Les rapports de la colonne 3 confirment naturellement les prévisions, puisqu'ils ne dépendent que de la nature et de la proportion des sucres présents; mais on voit que les chiffres trouvés pour les levures 3 et 4, comme exprimant le rapport des pouvoirs rotatoires, ne sont pas vraisemblables; et, en conséquence, les chiffres du tableau VI les concernant s'éloignent sensiblement de la réalité. Les autres valeurs trouvées rentrent à peu près dans les limites prévues et reflètent assez fidèlement la composition des mélanges de sucres restants.

***

L'ensemble des renseignements qui précèdent montre que les levures examinées ne sauraient être identifiées entre elles; elles constituent autant de variétés distinctes.

On peut cependant recueillir encore quelques caractères différentiels relatifs à la façon dont elles se développent sur divers milieux, à l'aspect des cultures, à leur résistance aux acides ou aux alcalis et enfin à leur morphologie. Je résumerai brièvement tous ces caractères qui ne présentent pas une très grande fixité, et qui sont probablement destinés à se modifier un peu, étant donnés les changements profonds apportés dans leur existence par les conditions nouvelles qui leur sont imposées.

J'ai donné dans les tableaux II, III, IV, la durée des fermentations; on a vu qu'elle est variable pour les diverses espèces dans un même milieu, et pour une même espèce d'un milieu à un autre.

Les différences que je vais noter par la suite ont été relevées sur des cultures effectuées dans des tubes à essai de 18 m. m. de diamètre. Chaque tube recevait environ 15 c. c. d'un bouillon identique à celui qui a servi aux expériences résumées dans le tableau IV. La semence a été empruntée également au dépôt formé dans ces cultures et répartie à raison de 2 gouttes par tube.

J'ai groupé les renseignements obtenus dans le tableau suivant:

TABLEAU IX

Levures.	Aspect des cultures. au 7e jour.	Après un mois de conservation.
—	—	—
1	liquide louche	bourrelet.
2	clair	—
3	trouble	—
4	—	—
5	—	rien.
6	—	bourrelet.
7	louche	—
8	clair	—
9	—	voile fragile
10	—	voile.
11	trouble	voile.
a	—	bourrelet.
b	trouble formé de grumeaux	voile.
c	trouble	bourrelet.

La plupart des levures troublent le liquide; ce trouble est plus ou moins persistant; il dure jusqu'à la fin de la fermentation avec les levures *a* et *c*; quelques-unes laissent le milieu parfaitement limpide pendant toute la durée de la fermentation, ce sont 2, 8 et 9. La levure *b* forme des grumeaux qui, vers le 5e jour, sont entraînés à la surface par le dégagement du gaz et produisent un voile factice qui tombe plus tard; la levure 11 produit le même voile. Si on conserve les levures pendant 1 mois, on remarque que quelques-unes donnent des voiles; mais le plus grand nombre forment un simple bourrelet autour du ménisque dans la zone d'influence des forces capillaires.

Quant au développement, il n'offre rien de particulier; la fermentation se déclare en moins de 24 heures à la température de 26°, cependant la levure *c* est notablement inférieure aux autres au point de vue du développement et de la rapidité avec laquelle apparaît la fermentation.

Avec les milieux solides on ne peut également faire que des observations de peu d'importance. Un seul met en relief quelques caractères assez tranchés; c'est la gélose préparée avec du bouillon de haricot neutre additionné de 3 0/0 de saccharose. Un certain nombre de levures présentent en effet sur ce milieu, lorsqu'elles sont ensemencées en surface, une couleur rouge lie de vin, plus ou moins prononcée; ce sont: 2, 8, 9, 10 et *b*; 2 et 10 se colorent très fortement; 2 laisse diffuser la matière

colorante dans la gélose; la levure 9 est modérément teintée; 8 encore plus faiblement, et enfin, avec *b*, la couleur n'apparaît que dans les régions les plus saillantes et peut manquer complètement.

Sur gélose acide, la couleur rouge est beaucoup moins prononcée; 8 et *b* ne se colorent pas sur ce milieu.

Si on examine l'action des levures sur les sucres fermentescibles les plus répandus, on constate qu'elles font fermenter le maltose en moût de bière, le saccharose, le sucre interverti, même en liquide Raulin, et par suite le dextrose et le lévulose offerts séparément; mais la levure 3 a donné lieu à des observations assez curieuses sur lesquelles je reviendrai plus loin.

Considérées au point de vue de leur résistance aux acides et aux alcalis, elles se conduisent, à peu d'exceptions près, de la même façon. Comme substance alcaline, j'ai employé la soude à l'état de carbonate de sodium, et comme acide, j'ai accordé la préférence à l'acide lactique.

En milieu alcalin, si la levure se développe, elle finit toujours par faire fermenter le lactose; mais, dans les liqueurs acides, on constate d'abord la disparition de la propriété de faire fermenter le lactose, la fermentation étant caractérisée par une effervescence visible lorsqu'on donne aux tubes quelques légères secousses; il y a une limite d'acidité au delà de laquelle la levure se développe péniblement, mais sans faire fermenter; elle mène une vie végétative fort difficile d'ailleurs; puis l'arrêt du développement se constate à son tour, si l'on exagère encore les doses d'acide. Ce sont là des faits qui s'expliquent d'eux-mêmes, comme on le sait; si la levure peut se développer, elle diminue l'alcalinité et atténue par conséquent l'influence nocive de la réaction, tandis qu'elle augmente au contraire le rôle empêchant de l'acidité.

Toutes les levures font fermenter le lactose dans le bouillon que j'ai utilisé en présence de 0,88 0/00 de soude, employée, je le répète à l'état de carbonate de sodium, tandis qu'à 1,1 0/00 aucune ne se développe. Quelques-unes parviennent à faire fermenter le sucre de lait dans le bouillon additionné de 2 0/0 d'acide lactique libre; ce sont 5, 6, 11, *a* et *c*; toutes les autres se développent également à l'exception de 2, mais ne produisent

pas de fermentation ; à la dose de 1 0/0, la levure 2 ne fait plus fermenter ; elle se développe encore à 1,5 0/0.

Quelques éléments de différenciation peuvent être tirés aussi de leur morphologie ; mais, dans l'ensemble, il est certain que les ressemblances l'emportent sur les différences. Ce n'est pas le microsrope qui nous fournira les moyens de les distinguer.

Une seule, le n° 5, en 24 heures, a donné des spores sur blocs de plâtre, à la température de 26° ; malgré plusieurs tentatives faites en employant des levures de divers âges, mais toujours âgées de moins de 8 jours, je n'ai pas réussi à en faire produire à d'autres.

***

La manière dont se comporte la levure 3 cultivée en présence de divers sucres mérite, comme je l'ai dit, d'être examinée ; elle ne fait fermenter ni le saccharose, ni le maltose, ni le sucre interverti et, par suite, le dextrose et le lévulose offerts séparément.

Quand je dis qu'elle ne fait pas fermenter ces sucres, cela signifie que, pendant toute la durée des cultures, on ne constate à aucun moment le moindre dégagement de gaz, même au moyen d'une agitation énergique ; mais si on recherche l'alcool dans les cultures, on en trouve toujours un peu.

Cette particularité est assez curieuse si l'on songe que, dans un milieu additionné de 10 0/0 de lactose, cette levure fait fermenter le dextrose dans des proportions assez élevées. Lorsque le lactose atteint 14 0/0, elle laisse une plus grande quantité de dextrose comme résidu, mais pas plus que la levure 9 qui fait fermenter tous les sucres étudiés indistinctement.

Si on la cultive dans un bouillon additionné de 5 0/0 de dextrose ou de lévulose, voici les quantités d'alcool que l'on obtient au bout de 14 jours.

TABLEAU X

	Acidité 0/00 en SO^4H^2	Alcool 0/0 en poids.
Glucose	0,539	0,60
Lévulose	0,437	0,57

Les cultures ont été effectuées dans des fioles de 125 c. c.

qui recevaient chacune 100 c. c. de bouillon ; la semence a été empruntée à une culture en présence de 10 0/0 de lactose.

Un peu plus de 1 0/0 de sucre a subi la fermentation alcoolique. Le développement, très lent, va cependant en progressant pendant toute la durée de l'expérience.

En réalité, il n'y a donc, *en apparence*, qu'une résistance plus forte à la fermentation, de la part de ces deux sucres ; la zymase ne fait pas complètement défaut ; mais il n'en est pas moins intéressant de voir que la levure 3, sortant d'une culture pourvue de lactose, ne soit pas plus active vis-à-vis du dextrose.

Pour pénétrer plus avant dans l'intimité de ce phénomène, j'ai effectué dans l'espace de 18 jours une série de 6 passages dans un milieu à peu près neutre, additionné de 5 0/0 de galactose. On voit donc que la semence transportée d'un tube à l'autre était toujours empruntée à une culture de 3 jours, au moment où la fermentation était déjà active. Le 6e passage a servi à ensemencer des milieux préparés avec un bouillon à peu près neutre, additionné de 5 0/0 de dextrose ou de lévulose, et de doses variables de galactose conformément aux indications suivantes :

TABLEAU XI

Milieu n° 1	Glucose 5 0/0	+	Galactose	0		témoin I.
2	—	— +	—	0,5 0/0		
3	—	— +	—	1		
4	—	— +	—	2		
5	Lévulose 5 0/0	+	—	0		témoin II.
6	—	— +	—	0,5		
7	—	— +	—	1		
8	—	— +	—	2		

L'expérience a duré 14 jours, voici les résultats qu'elle a donnés.

TABLEAU XII

Milieux.	Alcool 0/0 en poids.
1 témoin I	0,45
2	0,66
3	0,83
4	1,056
5 témoin II	0,36
6	0,40
7	0,50
8	0,80

Seuls, les nos 3, 4 et 8 ont montré pendant quelques jours

les symptômes d'une fermentation; mais elle était peu active; on n'a jamais observé de dégagement spontané de bulles de gaz au sein des liquides.

Les cultures ont été effectuées, comme celle du tableau X, dans des fioles de 125 c. c., chaque fiole recevant 100 c. c. de bouillon; ce n'est donc pas une aération trop active des liquides de culture qui a pu conduire à ces résultats.

Le développement a été encore très lent dans les témoins, et dans les n°s 2 et 6; mais il a progressé jusqu'à la fin; et quand on a arrêté les cultures, on ne pouvait pas les distinguer les unes des autres par l'abondance du dépôt de levures qui s'était formé au fond des fioles; l'allure a été pourtant différente dans les n°s 3, 4, 7 et 8; ici, en effet, la prolifération a été très active dès le début. Ces observations sont donc conformes à tout ce que l'on sait déjà sur la façon dont une levure se conduit vis-à-vis des sucres qu'elle fait fermenter ou qu'elle brûle peu à peu, sans les dédoubler d'une manière active en alcool et acide carbonique.

Le galactose, sucre qui fermente bien, favorise la multiplication de la levure; le dextrose et le lévulose, très résistants à la fermentation, sont incapables de produire une active prolifération cellulaire.

Les exemples de ce genre ne manquent pas dans le monde des levures, mais, jusqu'à présent, on avait toujours constaté que c'étaient le lactose et le galactose qui offraient cette résistance à la fermentation.

En réalité, le lactose doit surtout son inertie à l'absence de lactase chez les levures ordinaires, et cela le met hors de cause en ce qui concerne les faits que l'on envisage ici; ceux-ci intéressent le galactose seul, car on s'aperçoit aisément que c'est la double question de la pluralité des zymases ou de l'adaptation d'une zymase à la fermentation de plusieurs isomères qui est en jeu ici.

Les levures ordinaires peuvent être, pour la plupart, accoutumées à la fermentation du galactose; lorsque cette accoutumance est acquise, elle se maintient de générations en générations, tant que celles-ci se succèdent dans un milieu pourvu de galactose; on ne saurait évidemment, en présence de ces faits, choisir entre les deux interprétations possibles.

La levure 3 fait fermenter le dextrose issu du lactose; la

zymase qu'elle produit est donc accoutumée à deux sucres ; on ne peut tirer de là une autre conclusion, étant donnée l'idée que nous nous faisons de l'accoutumance, en admettant bien entendu que l'accoutumance porte sur l'extension de l'activité de la zymase, et non sur l'aptitude du protoplasme à fabriquer un nombre plus ou moins grand de diastases; cette déduction se trouve d'ailleurs vérifiée pour toutes les levures de lactose étudiées; mais elle est fausse pour la levure 3; et dès lors il faut bien interpréter les faits d'une autre façon, et en conclure qu'il y a une dextro-zymase et une galacto-zymase ; les levures de lactose produisent les deux zymases; mais la levure 3 perd en grande partie sa faculté de produire la dextro-zymase lorsqu'elle est cultivée en présence du dextrose seul ; le galactose constitue pour elle, si l'on ne considère que les sucres, un aliment de premier ordre ; elle se développe activement en sa présence, ce qui veut dire qu'elle est surtout capable de produire de la galacto-zymase ; mais, en raison même de cette vigueur, elle peut fabriquer également beaucoup de dextro-zymase si on lui offre en même temps du dextrose, ce qui est la règle en présence du lactose ; elle ne conserve pas cette propriété dans un milieu additionné de dextrose ; il en résulte que son développement en souffre, et que la fermentation, très lente à se produire, reste toujours pénible.

Quand on la cultive pendant quelque temps en présence de galactose seul, et qu'on la replace ensuite dans un mélange des deux sucres en proportions variables, on voit, d'après les résultats du tableau XII, qu'elle a perdu en quelques jours la propriété de sécréter de la dextro-zymase en présence du galactose; cette faculté n'est pourtant pas annihilée ; les cultures témoins montrent en effet que le dextrose fermente encore à peu près avec la même activité que lorsque la semence est empruntée à une culture en présence de lactose, tableau X ; mais il n'est pas douteux que dans les cultures 2, 3 et 4, la levure a commencé d'abord par consommer le galactose et le faire fermenter ensuite là où il était assez abondant ; les cellules formées aux dépens du galactose n'ont pas montré, par la suite, une activité appréciable vis-à-vis du dextrose, puisqu'elles n'ont donné qu'un poids d'alcool très légèrement supérieur à celui qui correspond au galactose présent.

J'ai toujours placé en regard des résultats obtenus avec le dextrose ceux qui ont été fournis par des expériences parallèles effectuées avec le lévulose ; ils sont, comme on le voit, de même ordre ; ils sont aussi particuliers à la levure 3, toutes les autres font fermenter le lévulose.

La notion de la multiplicité des zymases n'a rien qui doive nous surprendre, étant données nos connaissances actuelles sur la variation du nombre de diastases qu'une cellule peut produire; elle rend compte, d'autre part, des distinctions si délicates que la cellule vivante établit entre les substances isomères ; elle nous permet également de comprendre pourquoi l'utilisation ou la fermentation de deux hexoses issus d'un disaccharide ou de deux isomères d'un mélange inactif ne se fait jamais d'une manière parfaitement parallèle.

CONCLUSIONS

Les levures de lactose sont très répandues dans la nature, au même titre que les levures de saccharose ou de maltose ; si on a pu les considérer comme des exceptions relativement rares, on doit admettre que leur monde est aussi peuplé en espèces que celui des premières, car un examen plus approfondi des fromages pourrait sans doute conduire à la découverte d'un grand nombre d'autres espèces.

Ces levures présentent cependant peu d'activité comme ferments alcooliques ; elles peuvent produire des quantités assez élevées d'alcool, mais à condition d'y mettre beaucoup le temps et de mettre en œuvre un poids de végétal relativement élevé.

Elles préfèrent généralement le galactose au dextrose ; la levure 3 examinée à ce point de vue présente des particularités assez curieuses qui ne peuvent s'expliquer que par la pluralité des zymases.

On peut se demander maintenant quel est le rôle des levures de lactose dans les fromages ; d'une manière générale, les fromages renferment peu de lactose ; et la faible quantité qui y persiste après l'égouttage est détruite de préférence par les ferments lactiques et les moisissures. En réalité il n'y en a guère que des traces qui subissent la fermentation alcoolique sous l'influence des levures ou des microbes producteurs d'alcool, et effectivement on en trouve dans tous les fromages ; mais comme

les levures communiquent aux milieux où elles se développent des qualités organoleptiques très marquées et souvent appréciées, il y a lieu de rechercher quel peut être leur rôle dans la production des bouquets. C'est une question qui a son intérêt pratique ; j'espère être bientôt en mesure de fournir là-dessus quelques renseignements.

INFLUENCE
DE LA CONFIGURATION STÉRÉOCHIMIQUE DES GLUCOSIDES
SUR L'ACTIVITÉ DES DIASTASES HYDROLYTIQUES

Par HENRI POTTEVIN

Il n'y a pas bien longtemps encore, le rôle physiologique attribué aux diastases était des plus limités ; il se réduisait à présider aux transformations (changements d'état physique, ou dédoublements moléculaires) que doivent subir les aliments pour devenir aptes à pénétrer dans l'intérieur des cellules et à être utilisés par elles. Dans ces dernières années, ce cadre s'est considérablement élargi, et la plupart des phénomènes intracellulaires dont la production était considérée comme l'apanage du protoplasma vivant (combustions respiratoires, fermentations anaérobies, synthèse de molécules complexes), relèvent clairement aujourd'hui d'actions diastasiques ; si bien que la chimie biologique se trouve peu à peu ramenée à l'étude d'un certain nombre de ferments solubles, susceptibles d'être isolés des cellules et d'exercer en dehors d'elles leur activité spécifique.

Lorsqu'on veut aborder de front les transformations biochimiques des albuminoïdes, on est bientôt arrêté par l'insuffisance de nos connaissances sur la chimie de ces composés ; il n'en est plus tout à fait de même si on se tourne du côté des substances ternaires, celles-ci sont beaucoup mieux connues, et avec elles on peut, dans quelques cas, suivre d'assez près le mécanisme des actions diastasiques. L'étude de ces cas favorables est intéressante à double titre, d'abord à raison même de l'importance physiologique des phénomènes qu'elle éclaire, ensuite parce qu'elle fournit la seule base solide que l'on puisse donner aux inductions par lesquelles on essaie de pénétrer ce qui se passe dans les cas plus obscurs, et en particulier dans le domaine des corps azotés.

Les diastases hydrolytiques dont l'action s'exerce sur les dérivés des sucres constituent le groupe le mieux connu de ferments solubles ; à leur sujet, Fischer a le premier fixé l'atten-

tion sur les relations de structure moléculaire, qui semblent devoir exister entre la substance active et les corps qu'elle est capable d'hydrolyser. C'est à nos connaissances dans cet ordre d'idées que je me propose d'apporter une contribution.

I

On désigne sous le nom de glucosides des composés définis qui résultent de l'union des sucres avec des corps divers (acides, alcools, phénols, etc), et qui, sous l'influence des agents d'hydratation, fixent un certain nombre de molécules d'eau, et se dédoublent en leurs composants ; dans ce qui va suivre nous viserons seulement ceux qui dérivent de l'union des hexoses avec les alcools ou les phénols, mais parmi ceux-ci nous comprendrons les bihexoses et les trihexoses que l'on ne considère pas en général comme des glucosides, bien qu'ils le soient par toutes leurs propriétés et en particulier par la façon dont ils réagissent vis-à-vis des ferments solubles.

L'ensemble des propriétés des glucosides dont nous nous occupons conduit à les regarder comme des éthers-oxydes produits par la combinaison de deux molécules alkoylées, le sucre fonctionnant lui-même comme alcool, et à leur attribuer des formules analogues à la suivante :

$$CH^2OH - CHOH - \underset{|\text{———————}O\text{———————}|}{CH - (CHOH)^2 - CH} - O - CH^3$$

qui correspond à la combinaison d'un hexose

$$CH^2OH - CHOH - \underset{|\text{———————}O\text{———————}|}{CH - (CHOH)^2 - CHOH}$$

et de l'alcool méthylique $CH^3—OH$ avec élimination de H^2O.

On dispose aujourd'hui de méthodes dues à Fischer, à Van Eckenstein, à Michaël, qui permettent de préparer synthétiquement les glucosides correspondant à l'union de la plupart des alcools et de quelques phénols avec un sucre quelconque. Les glucosides synthétiques les mieux connus se présentent chacun sous deux formes isomères, dont l'existence découle théoriquement, comme une conséquence nécessaire, du fait que, dans la molécule de sucre, le carbone auquel est fixé l'oxhydrile qui s'éthérifie est asymétrique. Les deux composés que fournit avec un même hexose, le d-glucose (glucose ordinaire) par exemple,

un même alcool R.OH répondent aux deux formules stéréoisomères,

```
        H                              H
        |                              |
R—O—C ———————┐          ┌ ——————— C—O—R
        |              |          |                |
   H—C—O—H  |          |        H—C—OH
        |              O          O                |
 OH—C—H           |          |      OH—C—H
        |              |          |                |
       CH ———————┘          └ ——————— CH
        |                                          |
   H—C—OH                          H—C—OH
        |                                          |
      CH²OH                                CH²OH

  d-glucoside α                       d-glucoside β
```

Si donc on considère tous les glucosides dérivés du d-glucose, ils doivent pouvoir être rangés en deux séries d'homologues : celle des composés α et celle des composés β. En dehors des actions diastasiques que nous aurons à étudier plus loin, il n'existe aucun caractère physique ou chimique qui permette, d'une façon générale, un glucoside étant donné, de décider si sa place est dans l'une ou dans l'autre de ces deux séries ; pourtant, si on adoptait les vues de M. Simon [1], on trouverait dans le pouvoir rotatoire même du composé une donnée susceptible de lever l'indécision dans un certain nombre de cas. Pour interpréter l'ensemble des réactions du d-glucose, on a été conduit à admettre qu'il peut exister sous 3 formes, stable chacune dans des conditions déterminées, et répondant l'une à la formule aldéhydique de Berthelot [2], les deux autres aux deux stéréoisomères de la formule oxydique de Tollens citée plus haut. Lorsque Tanret eut découvert les trois formes tautomères du d-glucose, caractérisées, en particulier, par le pouvoir rotatoire instantané de leurs solutions aqueuses, on pensa tout de suite à rattacher ces formes aux formules précédentes : d'après Simon ce rattachement devrait être fait comme suit : la forme tautomère β qui, dissoute dans l'eau, prend immédiatement son pouvoir rotatoire limite de + 52°5, et qui est la forme stable en solution aqueuse, correspond à la formule aldéhydique ; les deux formes α (glucose ordinaire cristallisé) et γ, dont les pouvoirs rotatoires instantanés sont respectivement + 106° et + 22°,5, mais tendent à se rapprocher de + 52°, 5 par deux birotations

1. Simon, *Comptes rendus*, 25 février 1901.
2. $CH^2OH - (CHOH)^4 - COH$.

de sens inverse, correspondraient aux deux formules oxydiques. Les glucosides de la série α se rattacheraient à la forme tautomère α ; ceux de la série β, à la forme γ. Toutes les fois que le groupement alkoylé serait tel que sa substitution à l'oxhydrile OH ne modifie pas de façon essentielle les relations intramoléculaires, d'où dépend le pouvoir rotatoire, les glucosides α posséderaient une rotation spécifique droite supérieure à celle du glucose, et ceux de la série β une rotation gauche, ou droite mais inférieure à celle du glucose + 52°,5. Ces considérations, qui pourraient être étendues à tous les sucres, se vérifient bien pour les dérivés méthyliques des hexoses (les seuls pour lesquels on ait obtenu en fait les deux isomères à l'état isolé et pur), ainsi qu'on peut le voir par le tableau ci-dessous.

	α D (en solution aqueuse).
D-glucose.	+ 52°,5
Méthyl-d-glucoside α.	+ 155°.5
Méthyl-d-glucoside β.	— 31°,85
D-galactose.	+ 83°.2
Méthyl-d-galactoside α.	+ 178°,8
Méthyl-d-galactoside β.	+ ε

Nous examinerons par la suite dans quelle mesure les indications tirées de l'hypothèse de Simon cadrent avec celles que fournit l'étude des actions diastasiques.

Les glucosides sont extrêmement répandus dans les tissus vivants : à côté d'eux on trouve toujours les diastases qui doivent présider à leurs mutations et qui, capables selon toute vraisemblance d'en effectuer la synthèse, ont la propriété de les dédoubler par une action inverse de celle qui leur a donné naissance, fixation de H^2O et mise en liberté des composants. Chaque diastase est, en général, capable d'exercer son action hydrolytique sur un certain nombre de glucosides.

Considérons la maltase (ou plus exactement la solution de diastases que l'on obtient en faisant macérer dans l'eau de la levure de bière préalablement desséchée et tuée) et l'émulsine (solution fournie par les amandes amères). La maltase hydrolyse le maltose et le méthyl-d-glucoside α, elle n'attaque ni le méthyl-d-glucoside β ni les glucosides naturels (amygdaline[1], arbutine, salicine, coniférine, etc.) ; l'émulsine est

1. La maltase produit sur l'amygdaline une hydrolyse partielle : il ne se forme ni aldéhyde benzoïque ni acide cyanhydrique, mais des deux molécules de glucose

douée de propretés inverses, elle hydrolyse les glucosides naturels déjà cités, et le méthyl-d-glucoside β ; mais elle est sans action sur le maltose et le méthyl-d-glucoside α. Fischer, qui a découvert et généralisé ces faits, a admis pour les expliquer que la substance diastasique active possède une constitution stéréochimique en rapport avec celle des corps qu'elle est capable d'attaquer : la diastase et le glucoside seraient l'un à l'autre « ce que la clef est à la serrure »[1].

Les données qui définissent la stéréochimie d'un glucoside sont, d'après ce que nous avons dit plus haut : 1° la nature du sucre générateur ; 2° la position α ou β de la molécule alkoylée. Pour justifier l'hypothèse de Fischer, il faudrait établir par l'expérience que *chaque diastase limite son action aux dérivés d'un même sucre, et parmi ceux-ci aux homologues d'une même série α ou β*. Comme nous ne savons ni déterminer complètement un glucoside, ni séparer les uns des autres et isoler à l'état pur les divers ferments solubles, nous devons renoncer à la méthode simple qui consisterait à faire agir des diastases pures sur des glucosides bien définis, et force nous est d'aborder le problème par des voies détournées.

La maltase est caractérisée par la propriété de dédoubler le maltose en deux molécules de glucose : pour pouvoir dire qu'elle est inactive vis-à-vis des dérivés du d-fructose et du d-galactose par exemple, il faut et il suffit que nous trouvions un ou plusieurs mélanges diastasiques capables d'hydrolyser le maltose, contenant par conséquent de la maltase, et incapables d'agir sur aucun des dérivés des deux autres sucres. Prenons d'autre part la maltase et l'émulsine, chacune d'elles hydrolyse l'un des deux méthyl-d-glucosides, elles doivent représenter l'une la diastase des composés α, l'autre la diastase des composés β dérivés du d-glucose ; et il doit être possible dès lors de constituer avec les glucosides du d-glucose deux séries distinctes, sans termes communs, telles que tous les glucosides d'une série soient dédoublés par l'émulsine et non par la maltase, tandis que

que contient la molécule d'amygdaline, une se trouve détachée et il reste un glucoside nouveau : le nitrile amygdalique, entièrement dédoublable par l'émulsine.

1. Ce n'est pas tout à fait ainsi que l'entendait Fischer puisqu'il admettait, par exemple, que la maltase dédouble le maltose et le méthyl-d-fructoside, « à cause de la ressemblance de constitution entre le d-glucose et le d-fructose ». Mais il semble difficile de concevoir que la constitution du sucre lui-même ait moins d'importance au regard de la diastase que la position de la molécule éthérifiée.

pour ceux de l'autre série ce soit l'inverse. On devra raisonner de même pour chaque diastase et pour chaque sucre. La possibilité de vérifier expérimentalement les conséquences des idées de Fischer se trouve donc subordonnée à la connaissance de mélanges diastasiques doués de propriétés déterminées ; pour l'obtention de tels mélanges on n'a disposé jusqu'ici d'aucune méthode générale et on a dû se borner à tirer parti de ceux que le hasard a fait rencontrer. Il est naturel que les vérifications n'aient pu s'étendre au delà des diastases les plus communes (invertine, maltase, émulsine, lactase) et que, même dans ce domaine limité, elles n'aient pu se faire que par tâtonnements [1].

Les premières recherches de Fischer avaient abouti à des données un peu confuses [2]. Ce savant admettait, en particulier, que l'invertine hydrolyse à la fois le saccharose, le maltose et les méthyl-d-glucosides de la série α : plus tard il a trouvé que S. Marxianus, qui fait fermenter le saccharose et non le maltose, fournit une solution de ferments hydrolysant le saccharose, mais sans action sur le maltose et sur le méthyl-d-glucoside α ; tandis que pour le S. Octosporus c'est le contraire : cette levure fait fermenter le maltose et non le saccharose, elle fournit une solution de ferments hydrolysant le maltose et le méthyl-d-glucoside α, sans action sur le sucre de canne : il en a conclu que l'hydrolyse du saccharose et celle du maltose étaient l'œuvre de deux diastases différents, l'invertine et la maltase, cette dernière seule étant capable d'agir sur le méthyl-d-glucoside α [3]. En acceptant cette donnée, que nous aurons d'ailleurs l'occasion

1. Il existe beaucoup de glucosides dérivés du d-glucose, le saccharose en tête, la phlorididzine, le gallotannin, etc., qui résistent à l'action de l'une et de l'autre des deux diastases complémentaires, émulsine et maltase. Il n'y a là rien qui soit en contradiction avec les considérations que nous avons développées ; celles-ci, en effet, n'impliquent nullement que la constitution stéréochimique doive intervenir seule, comme condition unique, pour déterminer la façon d'être réciproque des glucosides et des diastases. D'une part la nature de la molécule alkoylée doit intervenir pour modifier la résistance du composé vis-à-vis d'une action hydrolytique quelconque, comme elle intervient pour modifier les chaleurs de formation et de dédoublement; d'autre part rien ne nous dit que tous les dérivés α du d-glucose soient bâtis rigoureusement sur un type unique, et qu'il n'existe pas entre eux des cas d'isomérie secondaire d'ordre non stéréochimique. Pour toutes ces raisons, on comprend qu'il puisse et qu'il doive exister plusieurs espèces, dans chacun des deux genres de diastases qui correspondent aux deux séries d'isomères α et β.

2. V. Duclaux, *Traité de Microbiologie*, t. II, p. 122 et suiv.

3. Fischer et Lindner, *Berichte*, XXVIII, p. 984.

de confirmer par la suite, on peut classer de la façon suivante les uns par rapport aux autres les glucosides et les diastases étudiés.

L'*invertine* dédouble le saccharose, le raffinose (en 1 molécule de lévulose et 1 molécule de mélibiose [1]), le gentianose (en 1 molécule de lévulose et 1 molécule de gentianobiose [2]).

La maltase dédouble le maltose, le méthyl-d-glucoside α [3], l'éthyl-d-glucoside α [4], le benzyl-glucoside et le glycérine-glucoside (ces deux dérivés n'ont été obtenus qu'à l'état de sirop incristallisable contenant un mélange des deux isomères α et β dont un seul est attaqué [5]), l'amygdaline [6], le tréhalose [7], le méthyl-d-fructoside [8].

L'émulsine dédouble l'amygdaline, la coniférine [9] et ses dérivés, la picéine, la salicine, l'hélicine, l'esculine, l'arbutine, le lactose et le méthyl-d-galactoside β [10], le benzyl-glucoside et le glycérine-glucoside (l'isomère qui n'est pas attaqué par la maltase [11]) le phénol-glucoside [12], le β carvacrol-glucoside [13].

La *lactase* dédouble le lactose.

La classification précédente est, en gros, d'accord avec la loi que nous avons énoncée, mais il y a contradiction sur quelques points.

Pour l'invertine il n'y a pas de difficulté, car les sucres hydrolysés peuvent tous les trois être considérés comme des dérivés du d-fructose (lévulose), le groupement alkoylé étant constitué respectivement par les molécules de glucose, de mélibiose, de gentianobiose, et rien ne s'oppose à ce qu'ils soient rangés dans la même série de d-fructosides.

Pour la maltase, nous trouvons à côté du maltose et du tré-

1. SCHEIBLER ET MITTELMEIER, *Berichte*, XXII, p. 3188. — BAU, *Wochensch. Brauerei*, XV, p. 389. — FISCHER, *Berichte*, XXVIII, p. 3034.
2. BOURQUELOT ET HERISSEY, *Journ. de Ph. et de Chim.*, 1902, p. 417.
3. FISCHER ET LINDNER, *L. c.*
4. FISCHER, *B.*, XXVII, p. 2985.
5. FISCHER, *B.*, XXVII, p. 2985.
6. FISCHER, *B.*, XXVIII, p. 1508. — V. p. 5, note.
7. FISCHER, *B.*, XXVIII, p. 1429. — BOURQUELOT, *C. R.*, CXVI, p. 826.
8. FISCHER, *B.*, XXVIII, p. 1429.
9. Pour les glucosides naturels, voir. VAN RIJN, *Die Glycoside*, Berlin, gebrüder Borntrager. 1900.
10. FISCHER, *B.*, XXVIII, p. 1429.
11. FISCHER, *B.*, XXVIII, p. 2400.
12. FISCHER, *B.*, XXVII, p. 2985.
13. HUGH RYAN, *Proced. Chem. Soc.*, XV, p. 196.

halose, qui se dédoublent tous les deux en deux molécules de d-glucose, un certain nombre de glucosides dérivant du même d-glucose, mais aussi un dérivé du d-fructose, le méthyl-d-fructoside.

Pour l'émulsine, tous les corps dédoublés dérivent du d-glucose, sauf le méthyl-d-galactoside β et le lactose. Le sucre de lait doit en effet être considéré comme un galactoside, car oxydé par le brome à froid, il donne un acide monobasique, l'acide lacto-bionique, que l'ébullition avec les acides étendus dédouble en galactose et acide gluconique : le groupement réducteur de la molécule de lactose appartient donc au glucose, qui intervient dans la formation du galactoside par un des groupes alcool de sa chaine.

Nous allons examiner successivement les points sur lesquels portent les discordances entre ces données et notre loi ; mais auparavant et pour n'avoir plus à y revenir, je vais fournir les indications nécessaires sur les glucosides synthétiques dont j'aurai à me servir.

Le méthyl-d-glucoside α et les deux méthyl-d-galactosides ont été préparés par les méthodes de Fischer [1] et de Van Eckenstein [2] ; le méthyl-d-glucoside a été purifié par des cristallisations successives dans l'alcool ; les deux méthyl-d-galactosides ont été séparés par cristallisation fractionnée dans l'éther acétique. Les corps bien cristallisés ainsi obtenus possédaient les constantes ci-dessous.

	Point de fusion.	Pouv. Rot. α D.
Méthyl-d-glucoside α.	165°	+ 158°.2
Méthyl-d-galactoside α.	110°	+ 177°.8
Méthyl-d-galactoside β.	176°	neutre.

Le méthyl-d-fructoside a été préparé en suivant les indications de Fischer [3]. On obtient ainsi un sirop incristallisable qui contient vraisemblablement un mélange des deux isomères α et β, il contient aussi toujours une petite quantité de lévulose non combiné. Pour éliminer le petit excès de lévulose qui eût été gênant dans certaines expériences, j'ai traité le sirop, convenablement étendu et stérilisé par filtration, par le *Saccharomyces*

1. FISCHER. *B.*, XXVIII, p. 1145.
2. VAN ECKENSTEIN. *Recueil des Tr. Ch. des Pays-Bas*, XIII. p. 183.
3. FISCHER. *B.*, XXVIII, p. 1145.

apiculatus. La levure cultivée sur de l'eau de touraillons glucosée solidifiée par la gélose avait été raclée, lavée à l'eau stérile, puis ajoutée aseptiquement au sirop. Après un mois de séjour à l'étuve, le liquide ne donnait plus de réduction appréciable à la liqueur de Fehling.

Le glycérine-glucoside a été préparé suivant les indications de Fischer et Bensch [1]. On obtient un sirop incristallisable renfermant un mélange des deux isomères α et β : ramené à la concentration de 10 0/0 (en glucoside supposé anhydre), il contenait encore 0,29 0/0 de glucose qui n'a pas été éliminé. Si on soumet le sirop à l'action séparée de la maltase et de l'émulsine, on constate que, sous l'influence des diastases, sa rotation spécifique diminue dans le premier cas, augmente dans le second, d'où il suit que les glucosides dédoublés possèdent des pouvoirs rotatoires qui sont, par rapport à celui du glucose, supérieur dans un cas, inférieur dans l'autre.

Un sirop de glycérine-glucoside, mélangé à son volume d'une solution diastasique filtrée, obtenue en faisant macérer, dans l'eau saturée de toluène, de la levure de bière préalablement desséchée à basse température, abandonné à l'étuve à 35°, a donné :

	Rot. α D.	Glucose en 100 c. c.
Au début.	+ 7°,8	0,14
Après 1 jour.	+ 6°,0	1,00
Après 3 jours.	+ 5°,2	1,19

Etant donnés la diminution subie par la rotation spécifique et l'augmentation de la teneur en glucose, on peut calculer le pouvoir rotatoire du glucoside qui a subi l'hydrolyse ; ce pouvoir serait, pour le corps $C^9H^{18}O^8$, de 160°

Dans une autre expérience, 0,5 d'émulsine sèche ont été délayés dans 20 c. c. d'eau et ajoutés à 50 c. c. du sirop de glycérine-glucoside ; le mélange a été saturé de toluène et placé à l'étuve à 35°, il a donné

	Rot. α D.	Glucose en 100 c. c.
Au début.	10°,6	0,20
Après 1 jour.	10°,2	0,46
Après 3 jours.	10°,0	0,59

L'augmentation du pouvoir rotatoire est faible mais certaine, je l'ai observée d'une façon constante en renouvelant à maintes reprises l'essai ; cet augmentation est trop voisine des erreurs

1. Fischer et Bensch, *B.*, XXVII, p. 2478.

inévitables de lecture pour qu'on puisse tirer de l'expérience, pour le pouvoir rotatoire du glucoside dédoublé, un nombre présentant quelques garanties d'exactitude, mais on est bien assuré que ce pouvoir rotatoire est inférieur à celui du glucose.

II

Fischer attribue à la maltase la propriété d'hydrolyser le méthyl-d-fructoside pour les raisons suivantes : la macération de levure fraîche contient de l'invertine, car elle hydrolyse le saccharose, mais elle n'attaque ni le maltose, ni les autres d-glucosides, ni le méthyl-d-fructoside; la macération obtenue en employant la levure préalablement broyée ou desséchée à basse température dédouble au contraire, outre le saccharose, le maltose, les méthyl-d-glucosides de la série α et le méthyl-d-fructoside. En précipitant cette macération par l'alcool, reprenant le précipité par l'eau, précipitant à nouveau, et ainsi de suite plusieurs fois, on obtient une diastase qui n'agit plus que sur le saccharose.

Si ces données impliquent que l'hydrolyse du méthyl-d-fructoside n'est pas le fait de l'invertine, elles n'excluent pas l'hypothèse d'après laquelle cette hydrolyse serait due à une diastase différente de la maltase, mais se comportant comme elle dans les conditions des expériences sus-visées ; il faut remarquer en effet que les propriétés de diffuser péniblement au travers des parois cellulaires intactes et de perdre rapidement toute activité par des précipitations successives à l'alcool sont communes à la plupart des ferments solubles.

Pour trancher la question, nous allons rechercher s'il existe des solutions de diastases capables d'hydrolyser le maltose sans attaquer le méthyl-d-fructoside. J'ai obtenu des mélanges diastasiques jouissant de ces propriétés avec le *schizosaccharomyces octosporus*, le *mucor alternans*, le *mucor mucedo*, etc.

J'ai isolé de sur des figues de Smyrne, en suivant les indications de Beijerinck [1], un organisme présentant tous les caractères

1. V. Duclaux. *Microbiologie*, t. III, p. 635.

du *schizo-saccharomyces octosporus*. La culture qui a servi aux expériences contenait un mélange de cellules asporogènes rondes ou légèrement elliptiques, d'un diamètre de 6 à 10 μ, et de cellules sporulées, grosses, atteignant 18 et 20 μ, et présentant à leur intérieur les 8 ascospores caractéristiques; cette culture donnait sur mout de bière gélosé une couche blanche, légèrement teintée de brun.

Ensemencé dans du mout de bière, mon schizo-saccharomyces se développe en déterminant rapidement une fermentation assez active; il se comporte de même dans l'eau de touraillons additionnée de maltose, de glucose ou de lévulose, mais il ne détermine aucune fermentation dans l'eau de touraillons additionnée de saccharose.

Pour expérimenter avec les glucosides de synthèse, le schizo-saccharomyces était cultivé sur mout de bière gélatiné dans des boîtes de verre, la culture raclée était mise en suspension dans l'eau stérile, lavée à plusieurs reprises par décantation, puis introduite avec pureté dans des tubes à essai stériles, où on ajoutait ensuite les solutions des glucosides à 10 0/0, stérilisées par filtration : avec le maltose, le méthyl-d-glucoside α, le glycérine-glucoside; on a observé des fermentations actives. Dans les deux derniers cas, le dégagement d'acide carbonique était moins vif que dans l'autre, mais il se prolongeait plus longtemps : au bout de 8 jours 70 0/0 du maltose avait disparu, et la fermentation était extrêmement ralentie; il restait encore 60 0/0 de méthyl-d-glucoside et 80 0/0 de glycérine-glucoside, la fermentation se poursuivait dans ces deux cas aussi active qu'au début.

Avec le saccharose et le méthyl-d-fructoside, il n'y a pas eu de fermentation; après 8 jours de séjour à l'étuve le pouvoir rotatoire du liquide n'avait pas changé, preuve que les glucosides n'avaient subi aucune attaque; à ce moment l'addition d'un peu de levure de bière dans les tubes en expérience déterminait au bout de quelques heures une fermentation énergique.

Le mucor mucedo et le mucor alternans sont des organismes bien connus; il n'y a pas lieu d'insister sur leurs caractères. Pour l'expérience, ils étaient cultivés sur mout de bière, dans des fioles à fond plat dont le goulot était fermé par un bouchon

traversé par deux tubes; l'un de ces tubes s'arrêtait au haut de la fiole tandis que l'autre descendait jusqu'au fond; grâce à ce dispositif, on pouvait facilement renouveler aseptiquement le liquide au-dessous de la culture.

Les champignons formaient à la surface du liquide un mycélium spumeux et déterminaient un dégagement d'acide carbonique actif. Quand le développement de la culture était suffisant, on soutirait le liquide, on le remplaçait par de l'eau stérile, on lavait ainsi à plusieurs reprises le mycélium, puis on introduisait une solution à 10 0/0 du glucoside à étudier, préalablement stérilisée par filtration : en agitant la fiole on immergeait autant que possible le champignon, et on abandonnait à l'étuve à 35° après avoir fermé à la lampe le tube plongeant et relié l'autre à un tube recourbé s'ouvrant sous le mercure.

Avec le maltose, le méthyl-d-glucoside α, le glycérine-glucoside, j'ai obtenu des dégagements rapides d'acide carbonique; avec le saccharose et le méthyl-d-fructoside, il ne s'est pas produit de dégagement appréciable : comme dans le cas du *schizosaccharomyces octosporus* au bout de 8 jours, le pouvoir rotatoire des solutions n'avait pas varié.

Le fait que le méthyl-d-fructoside ne fermente avec aucun des organismes mis en œuvre implique bien qu'il n'est pas dédoublé par leurs diastases, pourtant très actives vis-à-vis du maltose et des d-glucosides; j'ai tenu cependant à vérifier directement le fait. Pour obtenir les solutions de diastases, les organismes (culture raclée de sur gélose au moût de bière pour le *S. octosporus*, *mycelium* prélevé sur moût de bière après lavage à l'eau pour les mucors) étaient broyés à la molette avec du verre pilé jusqu'à ce que l'examen microscopique de l'espèce de pâte homogène ainsi obtenue montre qu'une bonne partie des cellules avait été dilacérée, puis mis à macérer 24 heures dans l'eau chloroformée.

Le liquide de macération était privé de chloroforme à 45° sous pression réduite et stérilisé par filtration. Chaque essai se faisait en mélangeant dans un tube stérile 5 c. c. de la solution diastasifère et 5 c. c. de la solution à 10 0/0 des glucosides filtrés; les tubes étaient ensuite fermés à la lampe, vides d'air, et abandonnés à l'étuve à 35°. En procédant ainsi on évite les causes d'erreur qui viennent fausser les résultats lorsqu'on opère en milieu

non stérile additionné d'antiseptiques; ceux-ci ne sont jamais absolument indifférents vis-à-vis des diastases, ils exercent toujours sur elles une influence dont il est d'autant plus difficile de tenir compte qu'elle varie d'une diastase à l'autre et, avec une même diastase, selon les conditions de l'expérience.

La précaution de sceller les tubes à la lampe, vides d'air, évite l'altération des substances actives qui se produit en général assez vite à 35° au contact de l'oxygène; on peut dès lors prolonger le contact des ferments et du glucoside autant qu'on veut, en sorte qu'une quantité même extrêmement faible de ferment arrivera toujours à produire une action appréciable.

J'ai opéré suivant la même technique dans tous les essais que j'aurai à rapporter plus loin : l'indication est dès maintenant donnée une fois pour toutes.

Exp. I. Les essais faits comparativement avec le saccharomyces octosporus, les deux mucors et une levure de Frohberg ont donné les résultats suivants.

Glucoside mis en œuvre.	Durée de l'action.	Sucre réducteur total (en glucose) produit par les diastases			
		de S. Octosp.	de M. Mucedo.	de M. alt.	de Lev. Froh
—	—	—	—	—	—
Maltose.	8 jours	0,18	0,16	0,22	0.20
Saccharose.	8 —	0,30	0,25	0,38	0.42
Méthyl-d-gluc. α.	8 —	0,09	0,07	0,15	0.15
Methyl-d-fruct.	1 mois	0	0	0	0.12

Il est donc bien établi qu'on ne peut attribuer à une seule et même diastase l'hydrolyse du maltose et celle du méthyl-d-fructoside. N'étaient les observations de Fischer rapportées plus haut, en présence du fait que toutes les levures capables d'attaquer le saccharose attaquent aussi le méthyl-d-fructoside, on inclinerait à ranger ce dernier parmi les glucosides qui relèvent de l'invertine. Peut-être les observations de Fischer pourraient-elles s'expliquer par la résistance du fructoside à l'action des ferments, résistance certainement supérieure à celle du sucre de canne. Mais à raison de l'incertitude qui règne sur la composition des mélanges que nous appelons d'un même nom, méthyl-d-fructoside, il n'y a pas lieu de pousser plus loin sa comparaison avec le saccharose.

Nous laisserons donc de côté la question de savoir si les deux



glucosides sont hydrolysés par une seule diastase ou par deux diastases différentes ; le seul point qu'il nous importe d'avoir bien fixé, c'est que le méthyl-d-fructoside n'est pas hydrolysé par la maltase.

Il m'a paru intéressant de rechercher comment se comportent vis-à-vis des glucosides synthétiques la maltase du sang et celle de l'urine. Fischer avait annoncé[1] des expériences établissant que la maltose du sang de bœuf et celle du sang de cheval hydrolisent le maltose, mais sont sans action sur le méthyl-d-glucoside α; il n'est pas à ma connaissance que ces expériences aient été publiées depuis.

Pour les expériences sur la maltase du sang, le sang était recueilli aseptiquement, le sérum séparé de même était mélangé dans des tubes stériles à la moitié de son volume d'une solution de glucoside filtrée. On appréciait la marche de l'action diastasique par la variation du pouvoir rotatoire du mélange et par un dosage du sucre réducteur formé (avant ce dernier dosage, le mélange était privé de ses matières albuminoïdes par ébullition avec l'acide acétique au 1/1000, puis avec l'acétate de fer; ce traitement est sans action sur les glucosides méthylique et glycérique, aussi bien d'ailleurs que sur le maltose). L'action diastasique s'accomplissait à la température de 35°.

Exp. II. — Sang de cheval (nourriture mixte, foin et avoine), pris dans la jugulaire, sur l'animal à jeun. Chaque tube recevait 10 c. c. de sérum et 5 c. c. de la solution des glucosides.

Glucosides mis en œuvre.	Durée de contact.	Glucose produit.
Maltose.	8 jours	0,39
Méthyl-d-glucoside α.	8 —	0,20
Glycérin-glucoside.	8 —	0,12

Exp. III. — Sang de lapin. A, lapin nourri d'herbe ; B, lapin nourri de son et d'avoine. 5 c. c. de sérum et 2,5 c. c. de solution de glucoside à 25 0/0.

1. Fischer, *B.*, XXVIII, p. 1429.

Glucosides mis en œuvre.	Durée de contact.	Glucose produit.	
—	—	A	B
Maltose.	8 jours	0,49	0,15
Méthyl-d-gluc. α.	8 —	0,22	0.08
Glycérine-gluc.	8 —	0,16	0.02

L'urine était mélangée à son volume (10 c. c. de la solution des glucosides à 10 0/0), le mélange saturé de chloroforme était abandonné à 35° dans des tubes scellés.

Exp. IV. — Urine du matin (homme, régime mixte).

Glucosides mis en œuvre.	Durée de contact.	Glucose produit.
—	—	—
Maltose.	2 jours	0,20
Méthyl-d-gluc. α.	2 —	0,12
Glycérine-gluc.	2 —	0,07

La maltase du sang et celle de l'urine sont donc capables d'hydrolyser non seulement le maltose, mais encore le méthyl-glucoside α; elles ne se distinguent pas de la maltase des ferments[1].

Nous allons envisager maintenant l'anomalie relevée parmi les glucosides hydrolysés par l'émulsine, et nous procéderons comme dans le cas précédent, nous chercherons s'il existe des mélanges diastasifères capables d'hydrolyser les glucosides de la série β, mais sans action sur le lactose et sur le méthyl-d-galactoside β. Le sucre de lait constitue un édifice moléculaire particulièrement résistant vis-à-vis des actions biochimiques en général; la presque totalité des levures est hors d'état d'agir sur lui, et même, pour celles qui peuvent le faire fermenter, il constitue un aliment bien inférieur au sucre de canne; enfin, beaucoup de mucédinées, pourtant très polyphages, ne peuvent se développer si on les ensemence directement sur un milieu de culture contenant du lactose comme unique aliment hydrocarboné. Il était indiqué de demander à ces moisissures des mélanges diastasifères incapables de dédoubler le lactose, tout en étant capables d'agir sur l'ensemble des d-glucosides β.

L'*Aspergillus niger* cultivé sur liquide Raulin normal (où l'aliment hydrocarboné est le sucre de canne) fournit par macération dans l'eau chloroformée un liquide riche en diastases

1. V. Bourquelot et Hérissey, *Bulletin Soc. mycolog.*, 1894.

diverses, cette solution de ferments hydrolise le saccharose, le maltose et les d-glucosides de la série α, les d-glucosides de la série β, mais il est sans action sur le sucre de lait et sur les deux méthyl-d-galactosides.

Exp. V. — Les solutions diastasiques, privées de chloroforme et filtrées, et les glucosides ont été mis en présence dans des tubes scellés, comme il a été dit plus haut, puis abandonnés à la température de 35°. Les résultats ont été les suivants :

Corps mis en expérience.	Teneur 0/0 du mélange en glucoside dissous.	Durée de l'action.	Glucoside dédoublé 0/0
Saccharose.	10	3 jours	83
Maltose.	10	—	67
Méthyl-d-glucoside α.	5	—	39
Amygdaline.	4	—	64
Arbutine.	4	—	52
Lactose.	10	1 mois	0
Méthyl-d-galactoside α.	5	—	0
Méthyl-d-galactoside β.	5	—	0

Il apparaît donc qu'on ne peut attribuer à une seule et même diastase le dédoublement des d-glucosides de la série β et celui du lactose et du méthyl-d-galactose β ; l'hydrolyse de ces deux derniers composés par l'émulsine, qui est réelle, est due certainement à la présence d'une lactase dans l'extrait d'amandes.

Les spores d'*Aspergillus niger*, semées sur un liquide Raulin où le saccharose est remplacé par du lactose, donnent des filaments mycéliens qui n'acquièrent pas un développement supérieur à celui qu'ils peuvent acquérir dans le même liquide privé de sucre ; mais si, sous une culture florissante d'*Aspergillus*, on remplace le liquide nourricier par une solution de lactose additionnée de sels, la plante continue à se développer et consomme le sucre de lait. Si on prélève alors le mycélium, il donne encore, par simple macération dans l'eau chloroformée, une solution de ferments inactive sur le lactose et sur les méthyl-d-galactosides ; mais si on broie la plante avec du verre pilé, avant de la mettre à macérer, on obtient une solution qui dédouble le lactose et le méthyl-d-galactoside β, mais respecte le méthyl-d-galactoside α.

Exp. VI. — Macération de mycélium broyé : 5 c. c. de macération et 5 c. c. de solution des glucosides à 10 0/0.

Corps mis en expérience.	Durée du contact.	Glucoside dédoublé 0/0.
—	—	—
Lactose.	2 jours	30
—	1 mois	60
Méthyl-d-galact. α.	—	0
Méthyl-d-galact. β.	—	48

Si, au lieu d'un liquide Raulin lactosé, on introduit sous l'*Aspergillus* une solution de méthyl-d-galactose β, celui-ci est consommé, et la plante broyée fournit une solution de diastases dont les propriétés sont identiques à celles du mélange obtenu avec le lactose. Il n'en est plus de même si on remplace le galactoside β par son homologue α : celui-ci est bien encore décomposé et brûlé par la moisissure, mais la lactase qu'il fournit diffère de la première, elle hydrolyse le méthyl-d-galactoside α, mais reste inactive vis-à-vis du lactose et du méthyl-d-galactoside β.

Exp. VII. — Macération d'*Aspergillus*, sous lequel on a introduit une solution de méthyl-d-galactoside β : 5 c. c. de solution diastasifère et 5 c. c. de solution des galactosides à 10 0/0.

Corps mis en expérience.	Durée de l'action.	Galactoside dédoublé 0/0.
—	—	—
Lactose.	1 mois	40
Méthyl-d-gal. α.	—	0
Méthyl-d-gal. β.	—	28

Exp. VIII. — Macération d'*Aspergillus*, sous lequel on a introduit une solution de méthyl-d-galactoside α, 5 c. c. de solution diastasique et 5 c. c. de solution des galactosides à 10 0/0.

Corps mis en expérience.	Durée de l'action.	Galactoside dédoublé 0/0.
—	—	—
Lactose.	1 mois	0
Méthyl-d-galact. α.	—	35
Méthyl-d-galact. β.	—	0

Comme le méthyl-d-galactoside β ne peut être isolé que péniblement, et en quantités relativement faibles, des liqueurs mères de cristallisation du dérivé α, et constitue par conséquent un produit précieux, il est commode, si on veut constater la production par l'*Aspergillus* des deux d-galactases séparément, de procéder comme il suit : en introduisant sous le mycélium un liquide Raulin à 5 0/0 de lactose, on détermine l'apparition de la diastase β ; en remplaçant le sucre de lait par le mélange

brut des deux méthyl-galactosides, on détermine l'apparition des deux diastases à la fois.

Il me paraît intéressant d'insister sur ce fait que, étant donné une plante ne sécrétant pas normalement de lactase, comme l'*Aspergillus niger*, on peut, en variant la nature de l'aliment qu'on lui offre, obtenir séparément chacune des deux galactases stéréo-isomères. La connaissance de pareils systèmes de diastases douées de propriétés complémentaires peut être extrêmement précieuse pour les recherches chimiques, car on peut demander aux ferments solubles, considérés comme réactifs spécifiques d'un certain groupement d'atomes, des indications que ne saurait fournir jusqu'ici aucune méthode chimique.

Nous venons de voir cesser l'anomalie que présentaient vis-à-vis de la loi dont nous poursuivons la vérification les dérivés du d-galactose. Le lactose et le méthyl-d-galactoside β sont homologues, ils ne sont pas hydrolysés par l'émulsine, mais ils le sont par la d-galactase de l'*Aspergillus niger* : d'après les expériences de Fischer, ils ne le seraient plus vis-à-vis de la lactase des levures.

Fischer[1] a opéré sur des grains de képhyr et des levures de lactose; les grains de képhyr mis à macérer dans l'eau lui ont donné un liquide diastasifère très peu actif; les levures de lactose, par simple macération dans l'eau, n'ont pas fourni de diastase en quantité appréciable: il a fallu pour en obtenir employer la levure broyée. Les mélanges diastasiques ainsi préparés ont dédoublé le lactose, mais non le méthyl-d-galactoside; il m'a semblé que ce résultat pourrait tenir d'une part à la faiblesse des extraits diastasiques mis en œuvre, d'autre part à la résistance plus grande du méthyl-d-galactoside, et peut-être aussi à l'influence de l'antiseptique (toluène) ajouté au mélange. J'ai repris ces expériences en employant les levures de lactose connues sous le nom de levures de Duclaux, de Kayser, d'Adametz; les résultats ont été les mêmes dans les trois cas. Les levures cultivées dans des boîtes de verre sur du petit lait solidifié par la gélose, raclées, lavées à l'eau stérile, et ajoutées à des solutions à 10 0/0 des galactosides, ont donné : avec le méthyl-d-galactoside α, pas de fermentation; avec le lactose et le méthyl-d-galactoside β, des

1. Fischer, *B*, XXVII, p. 3479.

fermentations actives. Dans le cas du lactose, la fermentation s'est déclarée en moins d'une heure; elle a été dès le début tumultueuse; au bout de 24 heures elle s'est apaisée, et après 48 heures le dégagement de CO^2 était devenu très lent, pour cesser complètement le 4e jour. Dans le cas du méthyl-d-galactoside la fermentation a été lente à s'établir, elle n'a commencé à donner un dégagement appréciable d'acide carbonique qu'au bout de 18 heures, elle n'a jamais pris par la suite un caractère tumultueux; par contre, au bout de cinq jours, elle ne manifestait pas encore de ralentissement sensible, elle n'a cessé d'être apparente qu'au 12e jour. Au bout de deux semaines les liquides ont été repris : dans les tubes à lactose tout le sucre avait disparu, à 1 ou 2 centièmes près : les contenus des tubes à méthyl-d-galactoside β ont été réunis et soumis à des distillations fractionnées pour concentrer l'alcool, ils ont fourni 15 c. c. d'un liquide dont la densité à 15°, prise par pesée, était égale à 0,9835, ce qui correspondrait à la présence de 1,49 d'alcool éthylique pur; cet alcool est nécessairement mélangé d'alcool méthylique dans une proportion voisine de 1/3, et la quantité trouvée provient de la destruction d'environ 2gr,4 de méthyl-d-galactoside sur 3 grammes mis en œuvre.

Les levures essayées sont donc capables de faire fermenter le méthyl-d-galactoside β; il en résulte qu'elles doivent sécréter une diastase capable de l'hydrolyser : l'expérience suivante montre qu'il en est bien ainsi; elle a été faite avec une solution de ferment obtenue en traitant comme il a été dit plus haut un mélange des trois levures broyées.

Exp. IX	Corps mis en expérience.	Durée du contact.	Galactoside dédoublé 0/0.
	—	—	—
	Lactose.	1 mois	65
	Méthyl-d-galactoside α.	—	0
	Méthyl-d-galactoside β.	—	37

De tout ce qui précède, nous pouvons conclure que les dérivés du d-galactose ne présentent pas plus que ceux du d-glucose des incompatibilités avec la loi de Fischer, telle que nous l'avons énoncée, et que dans les limites où elle a pu être soumise au contrôle de l'expérience, cette loi apparaît dégagée de toute contradiction.

III

La classification des diastases et des glucosides dédoublés par elles, que nous avions donnée plus haut, doit être corrigée et s'établit de la façon suivante; à côté du nom de chaque diastase figurent les glucosides qu'elle hydrolyse.

	Glucosides.	Pouv. rot. α D.
Invertine.......	Saccharose	
	Raffinose	
	Gentianose	
Maltase.......	Maltose	+ 140°
	Méthyl-d-glucos. α	+ 157°5
	Ethyl-d-glucos. α	+ 150,5
	Glycérin-glucos. α	+ 160
	Tréhalose	+ 190
	Benzyl-glucos. (1 isom.)	?
	Amygdaline	partt.
Emulsine.......	Amygdaline	— 36,3
	Nitrile amygdalique	— 26,9
	Coniférine	— 66,9
	Arbutine	gauche.
	Picéine	— 84
	Salicine	— 62,56
	Hélicine	— 60,43
	Esculine	?
	Méthyl-d-glucos. β	— 31,8
	Glycérin-glucos. β	gauche.
	Benzyl-glucos. β	?
	Thymol	?
	Carvacrol-gluc. β	?
— β Lactase....	Lactose	
	Méthyl-d-galactose β	
α Lactase.......	Méthyl-d-galactose α	

Pour les glucosides hydrolysés par la maltase et l'émulsine, nous avons inscrit en face de chacun de ceux qui sont connus à l'état pur et cristallisé, son pouvoir rotatoire. Si on fait abstraction de l'amygdaline, glucoside azoté dont la construction moléculaire est encore incertaine, on voit que les glucosides dédoublés par la maltase ont un pouvoir rotatoire droit supé-

rieur à celui du glucose (+ 52°,5), tandis que ceux qui sont dédoublés par l'émulsine ont un pouvoir rotatoire gauche.

Si nous nous reportons à l'hypothèse de Simon que nous avons exposée en commençant, nous voyons qu'il existe entre les données qui résultent de la façon dont les glucosides réagissent vis-à-vis des diastases et celles qu'on pouvait induire en faisant appel aux seules considérations théoriques, un accord qui valait d'être signalé.

Pasteur avait montré le rôle considérable que joue l'isomérie optique, et par conséquent la structure stéréochimique qui en est la traduction, dans les phénomènes chimiques de la vie des cellules; nous voyons aujourd'hui ce rôle se poursuivre dans le domaine des actions diastasiques. Chaque diastase agit sur un type stéréochimique déterminé, il est très naturel d'admettre que cela tient précisément à ce qu'elle est elle-même bâtie sur un type homologue.

ETUDES SUR L'HÉMOLYSE

Par le Dr HENRI LANDAU (de Varsovie)

Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.

Dans les recherches faites jusqu'à présent par divers auteurs au sujet de l'hémolyse, on s'est bien peu occupé des animaux à sang froid. Or, la façon dont ils se comportent à l'égard de l'hémolyse présente une question très intéressante à étudier, non seulement par elle-même, mais aussi en raison du fait que ces animaux possèdent des globules rouges nucléés. Jusqu'ici, on n'est pas encore fixé sur la manière dont se comportent les noyaux des érythrocytes en présence des hémolysines, car les opinions des auteurs divergent sur ce point. Ainsi, la plupart des savants, — je ne mentionnerai ici que les noms de Bordet[1], von Dungern[2], — en injectant du sang des oiseaux (poules, pigeons, oies) aux lapins ou aux cobayes, ont obtenu une hémotoxine qui dissout, tant *in vitro* qu'*in vivo* (dans la cavité abdominale), le protoplasma seul des globules rouges, sans jamais attaquer les noyaux; d'après Bordet, ces derniers deviendraient bien vite, dans la cavité abdominale des animaux immunisés, la proie des macrophages. Par contre, Krompecher[3] est arrivé à des résultats tout opposés : après avoir injecté pendant un temps prolongé (de 2 à 3 semaines) du sang de grenouille au lapin, il a obtenu un sérum qui dissout les hématies de la grenouille dans leur totalité, c'est-à-dire protoplasmas et noyaux ; ces derniers présentaient d'abord à leur périphérie des espèces de bourgeons, puis ils se segmentaient, ou bien se dissolvaient, ou encore se transformaient en longs filaments qui disparaissaient peu à peu. Si d'autres auteurs n'avaient pas observé les mêmes faits, c'est, pense Krompecher, parce qu'ils avaient expérimenté sur des animaux trop rapprochés dans l'échelle zoologique.

Les résultats obtenus par Krompecher nous ont paru intéressants à contrôler, ou respectivement à compléter par des expé-

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1899, p. 276.
2. *Münch. med. Wochenschr.* 1899, 13-14.
3. *Centralbl. f. Bakteriol.* 1900, XXVIII, p. 588.

riences sur d'autres animaux de la même catégorie, et, lorsque M. le Pr Metschnikoff nous proposa d'étudier la question dans son laboratoire, c'est avec empressement que nous nous sommes rendus à son invitation.

Nos expériences ont porté sur des grenouilles, notamment sur l'espèce verte (*Rana esculenta*) [1], puis sur les tortues de terre (*Testudo graeca*); le lapin fournissait le sérum hémolytique. Habituellement, on injectait dans la veine auriculaire du lapin soit du sang défibriné desdits animaux, soit du sérum seul, soit les globules obtenus par la centrifugation et lavés à plusieurs reprises avec la solution physiologique de sel. Ces préparations ayant été injectées en quantité plus ou moins considérable, on retirait, au bout d'un certain temps, du sang de l'animal soumis à l'expérience, et on le faisait agir sur les globules de la grenouille ou de la tortue. On examinait le phénomène macroscopiquement (dans le tube à essai) et microscopiquement (dans une goutte pendante), en déterminant la force hémolytique par la quantité minimum de sérum nécessaire pour dissoudre un centimètre cube de l'émulsion du sang à 5 0/0 dans une solution de sel marin à 0,85 0/0 en une heure, à la température de la chambre. Pour ramener le contenu de divers tubes à volume égal, on y ajoutait de la solution de chlorure de sodium.

Les résultats de nos expériences, dont le nombre s'élève à près de trente, sont assez homogènes et concordants entre eux. Tandis que le sérum du lapin normal agglutine faiblement les globules rouges de la grenouille et de la tortue, et ne les dissout point (même en proportion de 10 parties de sérum pour 1 partie de sang), — nous obtenions, six jours après une injection unique de 4 c. c. de sang — un sérum à action nettement hémolytique. A part certaines particularités individuelles, l'action du sérum croît proportionnellement au nombre d'injections reçues par l'animal, à la quantité de sang ou de ses éléments injectés, enfin au laps de temps écoulé depuis la première injection. Les plus actifs des sérums obtenus dans nos expériences dissolvaient le sang de grenouille ou de tortue en proportion de 1/10, en une heure de temps et à la température ordinaire. (La température de

1. Krompecher n'indique pas dans son travail l'espèce de grenouille employée; quant à nous, nous avons dû nous restreindre à l'espèce *R. esculenta*, vu la grande difficulté de se procurer la *R. temporaria*.

37° accélère l'hémolyse). En moyenne, nos sérums dissolvaient en proportion de 1/4.

Outre le pouvoir dissolvant, les sérums obtenus par nous présentaient, pour le sang des animaux respectifs, des propriétés agglutinantes et précipitantes. Toutefois, l'agglutination ne se produisait bien nettement qu'avec le sérum des animaux préparés par l'injection des globules seuls, dépourvus de sérum, et on ne l'observait pas du tout, si l'injection avait été faite avec du sérum sanguin seul. Si c'est le sang en totalité qui avait servi aux injections, les phénomènes de l'agglutination offraient un caractère intermédiaire entre les deux catégories précédentes. Autrement dit, le stade agglutinatif antérieur à l'hémolyse était le plus accentué sous l'influence des sérums provenant des animaux de la première catégorie, et n'apparaissait point avec le sérum des animaux de la seconde catégorie. Le sérum actif, ajouté au sérum de l'espèce animale pour le sang de laquelle il constitue un agent toxique, produit dans ce sang un trouble, et, après un certain temps, il se dépose au fond du vase des flocons très fins. Cette propriété précipitante est inhérente aux sérums de tous les animaux immunisés, quel que soit l'agent de l'immunisation : sang total ou ses éléments particuliers.

Conservés à la glacière pendant 24 heures, les sérums gardaient leur pouvoir hémolytique, qui ne disparaissait habituellement qu'au bout de 4 ou 5 jours. Une élévation de température à 55°, pendant une demi-heure, annulait le pouvoir dissolvant du sérum vis-à-vis des globules rouges, sans diminuer son action agglutinante, qui devenait même plus évidente. L'addition d'une certaine quantité de sérum frais de lapin neuf au sérum chauffé restituait complètement le pouvoir hémolytique à ce dernier.

L'examen microscopique nous a démontré que les globules rouges de la grenouille, aussi bien que de la tortue, subissent, sous l'influence du sérum actif, des modifications identiques et constantes : le globule change sa forme ovale en sphérique, le noyau devient plus net et se déplace du centre vers la périphérie de la cellule; en même temps, le globule perd progressivement sa coloration, devient de plus en plus pâle, enfin, il n'en reste plus qu'un mince rebord décoloré autour du noyau

fort accusé. Au bout d'un certain temps, habituellement après une heure, le rebord disparaît à son tour, et l'on ne trouve à ce moment qu'un dépôt abondant, formé d'amas de granulations et fort semblable aux amas de bactéries agglutinées et des noyaux très nombreux. Ces derniers sont entassés par places en amas assez considérables et répondent par leur quantité au nombre des hématies contenues dans la préparation donnée; leurs forme et structure ne diffèrent en rien des noyaux à l'état normal, leurs contours sont nets; ils se colorent parfaitement avec les couleurs basiques. Même après avoir tenu les préparations à l'étuve pendant 24 heures à la température de 37°, c'est-à-dire dans les conditions les plus favorables à l'hémolyse, nous n'avons pas vu disparaître les noyaux, ni observé aucune des modifications indiquées par Krompecher. C'est seulement après un temps plus prolongé (48 heures et au delà) que les noyaux commençaient à s'altérer : ils se ratatinaient ou se gonflaient, mais nous avons vu les mêmes phénomènes se produire pour les noyaux des hématies conservées pendant un temps prolongé dans une solution de chlorure de sodium à 0,85 0/0.

Vu la concordance parfaite des résultats de toutes nos expériences, nous nous bornons à rapporter seulement plusieurs exemples les plus caractéristiques.

Lapin n° 12 [1]. Le 24 mai 1902, on a injecté dans la veine auriculaire 1,5 c. c. de sang défibriné de grenouille [2]. Poids = 1.500 grammes. — Le 5 juin 1902, injection de 5 c. c. de sang de grenouille. Poids = 1.590 grammes. — Le 12 juin, injection de 7 c. c. Poids = 1.655 grammes. — Le 21 juin,

1. Il faut remarquer que le lapin n'est pas indifférent à l'introduction dans son organisme, resp. dans son système vasculaire, du sang ou du sérum de grenouille ou tortue, qui sont des agents violemment toxiques pour ses globules rouges. Les doses maximales supportées par les lapins de nos expériences étaient 9 c. c. de sang ou bien la quantité correspondante de globules, ou 8 c. c. de sérum. Certains animaux succombaient même après l'introduction de quantités bien plus faibles, telles que 3 ou 4 c. c., ce qui tient naturellement à une moindre résistance individuelle. L'autopsie de ces lapins ne révélait habituellement qu'une légère tuméfaction de la rate. Le sang retiré du cœur était stérile. Assez souvent, nous constations aussi une inflammation et de l'œdème autour du point d'injection, et ces lésions se terminaient par la nécrose et la chute de la portion correspondante de l'oreille. Krompecher a trouvé que les lapins succombent constamment, si l'injection de sérum de grenouille dépasse 1 c. c.; c'est ce que nos expériences ne confirment point.

2. Nous obtenions le sang des animaux (tant grenouilles que tortues) de la façon suivante. Après avoir desséché la surface cutanée, on séparait la tête du tronc à l'aide des ciseaux passés à la flamme, puis ayant recueilli le sang dans un vase stérilisé, nous le défibrinions en le battant énergiquement avec une baguette.

injection de 7 c. c. Poids = 1.560 grammes. — Le 30 juin 1902, saignée (de la carotide). — Le sérum dissout le sang de grenouille (en émulsion à 5 o/o dans une solution de NaCl à 0,85 o/o) en une heure, dans la proportion d'une partie de sérum pour 5 parties de sang, après l'avoir agglutiné; il se produit un dépôt abondant. Les noyaux restent intacts. — Le 8 juillet, injection de 8 c. c. de sang de grenouille. Poids = 1480 grammes. — Le 18 juillet, saignée. Le sérum dissout le sang de grenouille dans la proportion de 1 o/o, avec conservation des noyaux. Autres phénomènes comme précédemment.

*Lapin n*o 13. Le 22 mai 1902, on a injecté dans la veine auriculaire 2,5 c. c. de sérum de grenouille. Poids = 1.875 grammes. — Le 7 juin, injection de 4 c. c. de même sérum. Poids = 1.760 grammes. — Le 25 juin, injection de 6 c. c. Poids = 1750 grammes. — Le 4 juillet, saignée. Le sérum dissout le sang de grenouille (5 o/o dans une solution de NaCl à 0,85 o/o) au bout d'une demi-heure dans la proportion de 1 pour 4, sans produire d'agglutination préalable. Précipité fort abondant; conservation des noyaux. Le 10 juillet 1902, injection de 7 c. c. de sérum de grenouille. Poids = 1,850 grammes. — Le 25 juillet, saignée. Le sérum dissout de même les hématies de la grenouille dans la proportion de 1 pour 4 et attaque le protoplasma seul sans modifier le noyau.

*Lapin n*o 23. Le 15 juin 1902, on a injecté dans la veine auriculaire des globules provenant de 6 c. c. de sang de tortue, suspendus dans la solution physiologique de NaCl (les globules avaient été séparés par la centrifugation et puis lavés à plusieurs reprises dans la solution de sel). Poids = 1810 grammes. — Le 28 juin, injection de globules provenant de 7 c. c. de sang de tortue. Poids = 1.850 grammes. — Le 6 juillet 1902, injection des globules provenant de 9 c. c. de sang de tortue. Poids = 1.850 grammes. — Le 12 juillet, injection de la même quantité de globules. Poids = 1.740 grammes. — Le 17 juillet, saignée. Le sérum obtenu agglutine fortement les globules rouges de la tortue et les dissout dans la proportion de 1 pour 4 en une heure, à la température ordinaire. Les noyaux restent intacts. Le 18 juillet, injection de globules retirés de 9 c. c. de sang de tortue. Le 30 juillet, saignée. Le sérum a un pouvoir hémolytique de 1 : 5 et n'attaque pas les noyaux.

De ce qui vient d'être rapporté, il s'ensuit que, malgré le degré de préparation de nos animaux, bien supérieur à celui des lapins de Krompecher, la karyolyse a absolument fait défaut. Le même fait a été constaté pour l'hémolyse provoquée *in vivo*. En injectant, dans la cavité abdominale des animaux préalablement préparés, de 1 à 2 c. c. de sang défibriné de grenouille ou de tortue (ou mieux encore la même dose de globules suspendus dans une solution physiologique de sel marin), nous ne trouvions, dans l'exsudat de la cavité retiré de 15 à 20 minutes après l'injection — que des globules peu nombreux et notable-

ment décolorés à côté de nombreux noyaux soit libres, soit contenus dans des leucocytes mononucléaires. Après avoir injecté la même quantité de sang dans la cavité abdominale d'un lapin normal, on trouve au bout de 2 heures au plus, un nombre considérable de globules intacts[1].

*
* *

Comme Krompecher[2] l'avait déjà remarqué, une goutte de sang de grenouille ajoutée à une goutte de sang de lapin amène la dissolution rapide des globules rouges de ce dernier; mais, si l'on mélange le sang de grenouille au sang d'un lapin qui a préalablement reçu des injections de sang ou de sérum de grenouille, la dissolution n'a pas lieu, et les globules ne font que s'agglutiner. En examinant de plus près les réactions qui se produisent entre le sang des animaux à sang froid et les éléments du sang de lapin, nous nous sommes convaincu que le sérum des premiers (grenouille aussi bien que tortue[3]) possède des propriétés nettement hémolytiques envers les globules rouges du lapin. Une partie de ce sérum suffit pour dissoudre complètement les globules contenus dans 15 ou même 20 parties de sang de lapin (en émulsion à 5 % dans la solution physiologique de sel), au bout de quelques minutes.

D'après les recherches bien connues de Bordet, d'Ehrlich et Morgenroth sur l'origine des antihémolysines, il était à prévoir que le sérum des lapins auxquels on avait inoculé du sang ou du sérum de grenouille ou de tortue aurait le pouvoir de neutraliser l'action toxique du sérum desdits animaux sur les hématies du lapin; autrement dit, à côté du pouvoir hémolytique envers le sang de l'espèce animale qui a fourni le vaccin, le sérum en question possède un pouvoir antihémolytique envers le sang de leur propre espèce. C'est en effet ce que l'expérience confirme: l'addition d'une partie de nos sérums actifs à une partie de sérum de grenouille ou resp. de tortue suffit pour indiquer

1. Il serait intéressant de savoir comment se comportent, vis-à-vis des noyaux des globules rouges, les sérums provenant des animaux à hématies nucléées. Il n'existe à ce sujet dans la science aucune donnée. Gertes, Nolf (*Ann. de l'Instit. Pasteur*, 1900, p. 311) a injecté le sang des oiseaux (poules) aux oiseaux (pigeons), mais il n'obtenait qu'un sérum agglutinant sans action hémolytique.

2. *Loco cit.*

3. En ce qui concerne le sérum de grenouille, le fait est connu depuis longtemps. Voy. Landois, *Traité de Physiologie*, 1900, p. 26.

une influence antitoxique; mais, pour neutraliser complètement la toxicité dudit sérum, il faut employer de 12 à 15 parties de préparation antihémolytique.

***

On sait que les sérums actifs envers les cellules d'une espèce animale donnée et obtenus par voie d'immunisation de ces animaux peuvent agir également sur les cellules d'autres espèces plus ou moins rapprochées (Bordet[1], Ehrlich et Morgenroth[2], etc.); de même le sérum toxique pour certaines cellules de l'animal donné peut attaquer d'autres éléments cellulaires du même organisme (von Dungern[3], Moxter[4]).

Nos sérums hémolytiques, examinés à cet égard, ne se sont pas montrés tout à fait spécifiques. Il est vrai que les sérums actifs envers les globules rouges de la tortue n'attaquaient point les globules rouges de la grenouille, et inversement; mais chacun de ces deux sérums agissait sur le sang d'espèces plus rapprochées; ainsi, le sérum actif pour les hématies de la grenouille dissolvait les hématies du crapaud (*Bufo vulgaris*), du triton (*Triton cristatus*), de la salamandre (*Salamandra maculata*), de l'axolotl (*Siredon pisciformis*), et le sérum spécifique pour les globules rouges de la tortue terrestre agissait également sur le sang de la tortue d'eau (*Emys Europœa*). (Le sérum du lapin neuf se comporte envers les globules des animaux énumérés à peu près de même qu'avec le sang de grenouille ou de tortue de terre, c'est-à-dire qu'il ne les dissout point; seuls les globules rouges du crapaud semblent être sensibles, car ils se dissolvent dans le sérum du lapin normal, quand on met en contact une partie de sang et 10 parties de sérum). Toutefois, l'action des sérums spécifiques sur le sang des animaux ci-dessus mentionnés est en général bien plus faible que l'action des mêmes sérums sur le sang des animaux des espèces qui ont servi à l'immunisation des lapins; en outre cette action subit d'importantes oscillations individuelles, comme on le voit dans le tableau ci-joint. Quant à la marche du processus hémolytique dans ces cas de non-spécificité, elle

1. *Ann. de l'Instit. Pasteur*, 1899, p. 273.
2. *Berl. Klin. Wochenschr.*, 1901, p. 571.
3. *Munch. med. Wochenschr.*, 1899, p. 1228.
4. *Deutsche med. Wochenschr.*, 1900, p. 61.

ne se distingue en rien de ce que nous avons noté pour la grenouille et la tortue de terre : le protoplasma des hématies est seul attaqué, tandis que le noyau reste intact.

	Proportion à laquelle le sérum spécifique pour la tortue de terre dissout le sang (émul. 5 °/₀) de :		Proportion à laquelle le sérum spécifique, pour les globules rouges de la grenouille dissout le sang (émulsion 5 °/₀) de :				
	Tortue de terre.	Tortue d'eau.	Grenouille.	Crapaud.	Triton.	Salamandre.	Axolotle.
1.	1 : 4	1 : 1	1 : 5	2 : 1	3 : 1	3,5 : 1	5 : 1
2.	1 : 4	2 : 1	1 : 8	4 : 1	6 : 1	7 : 1	8 : 1
3.	1 : 5	2 : 1	1 : 10	3 : 1	4 : 1	4,5 : 1	6 : 1
4.	1 : 4	1,5 : 1	1 : 4	1 : 1	2 : 1	2,5 : 1	4 : 1

En outre, les quatre dernières rubriques pourraient nous amener à conclure qu'ils existe un rapport constant entre le degré de parenté zoologique des espèces animales données et l'action qu'un sérum hémolytique exerce sur leur sang, de sorte qu'en se basant sur ce facteur, il serait possible de déterminer jusqu'à un certain degré le rang occupé par une espèce donnée dans la classification zoologique.

L'imparfaite spécificité de nos sérums actifs existait aussi en ce qui regarde la propriété précipitante de ces sérums ; ainsi, le sérum spécifique pour le sang de grenouille, qui provoquait un précipité abondant dans le sérum de grenouille, précipitait de même le sang des autres batraciens cités (crapaud, etc.). Il n'existait pour les deux cas que des différences quantitatives, c'est-à-dire que le dépôt formé dans le sang des derniers était moins abondant et demandait, pour se produire, une proportion plus notable de sérum actif.

Même résultat pour le sérum actif contre le sang de la tortue de terre. Cette non-spécificité des précipitines prouve qu'il existe une parenté biologique entre les albumines provenant des diverses espèces animales, de même qu'entre les diverses albumines d'une même espèce, ce qui, du reste, a été déjà plus d'une fois constaté et, tout dernièrement, Linossier et Lemoine [1] ont obtenu des résultats analogues aux nôtres.

1. *Comptes rendus de la Soc. de biologie*, 1902, p. 276.

OBSERVATIONS
SUR LES MOUSTIQUES DES ENVIRONS D'ALGER

PAR MM. EDMOND SERGENT ET ÉTIENNE SERGENT

Ayant l'intention d'étudier et de combattre le paludisme en Algérie, nous avons pensé que l'étude des moustiques de ce pays s'imposait d'abord. Nous avons limité nos recherches, cette année-ci, à une zone d'environ 15 kilomètres de rayon autour d'Alger, où nous avons recueilli des Culicides à l'état larvaire ou adulte pendant les différentes saisons.

La région explorée comprend le massif de la Bouzaréa, fait de gneiss et de micaschistes, qui descend rapidement de 400 mètres d'altitude jusqu'à la mer, au nord et à l'est. Sur le flanc est s'étage la ville d'Alger. A l'ouest et au sud, les roches cristallophylliennes disparaissent sous les terrains calcaires qui constituent le Sahel algérien, chaîne littorale peu élevée et coupée de ravins, qui sépare la vaste plaine de la Mitidja de la mer.

Les moustiques capturés dans cette région appartiennent à 9 espèces, dont 5 connues et 3 nouvelles.

Ce sont :

Anopheles maculipennis (Meigen)[1];
Stegomyia fasciata (Fabr.);
Culex fatigans (Wiedemann)[2];
Culex pipiens (Linné);
Culex spathipalpis (Rondani);

1. Nous avons observé que les *A. maculipennis* algériens sont plus petits que ceux des environs de Paris. (En Algérie, femelles : 5 mm. 5 sans la trompe; mâles, 4 mm. 1/2 à 5 millimètres. En France, femelles : 6 mm. 1/2 à 7 mm. 1/2; mâles, 6 à 7 millimètres.)

2. Pour déterminer le *c. fatigans*, espèce très variable, nous nous sommes servis des caractères suivants, qui sont constants : Le siphon respiratoire de la larve est très long et étroit. Le rapport entre la plus petite largeur et la plus grande longueur de ce siphon est, en moyenne, de 1 à 15. [Chez le *c. pipiens*, il est de 1 à 7]. Chez la femelle, la première cellule sous-marginale de l'aile est trois fois plus longue que sa tige; chez le mâle, elle est deux fois plus longue que sa tige. La nervure transversale postérieure de l'aile est éloignée de la transversale moyenne de 1 fois 1/2 à 2 fois 1/2 sa propre longueur.

Culex lateralis (Meigen)[1].
Les espèces nouvelles sont :
Anopheles Algeriensis, n. sp. Theobald.
Culex Sergentii, n. sp. Theobald.
Culex Mariæ, n. sp.

Anopheles algeriensis. Theobald.

Cette espèce nouvelle est voisine d'*A. bifurcatus*. Elle semble en être la forme vicariante en Algérie. Elle en diffère par les caractères suivants : 1° taille moindre; femelle, 3 mm. 1/2 à 4 mm. 1/2, au lieu de 5 à 5 mm. 1/2; mâle, 3 à 4 millimètres au lieu de 6; 2° les nervures transversales des ailes sont différentes : chez *A. Algeriensis*, les nervures transversales antérieure et postérieure sont sur une même ligne dans les deux sexes. Chez *A. bifurcatus* femelle, la postérieure est interne; chez le mâle, c'est l'antérieure qui est interne; 3° les écailles latérales des nervures des ailes sont plus longues et plus minces chez *A. Algeriensis* que chez *A. bifurcatus*.

Les larves de *A. Algeriensis* présentent les particularités suivantes : les soies médianes et angulaires de la tête sont tantôt absolument dépourvues de ramuscules comme chez *A. bifurcatus* (18 sur 46 larves examinées); tantôt garnies de poils courts, comme chez *A. superpictus* (3 sur 46) examinées); ou bien les soies médianes sont simples, et les angulaires se divisent en 2 ou parfois 3 rameaux (25 sur 46 examinées).

Dans les œufs, les chambres à air sont très volumineuses. Elles occupent plus des 2/3 de la longueur totale de l'œuf. Après la ponte dans les bocaux de laboratoire, les œufs sont disposés irrégulièrement à la surface de l'eau, parfois en étoile, parfois parallèles entre eux, parfois isolés.

Culex Sergentii. Theobald.

Cette espèce est voisine de *C. geniculatus* Olivier (=*C. hortensis* Ficalbi). Elle se caractérise par des bandes blanches apicales se continuant avec des taches blanches latérales triangulaires, sur chaque segment de l'abdomen, tandis que chez *C. geniculatus*, les bandes des sommets de chaque segment sont simples, sans expansions latérales (Theobald).

1. Chez les *c. lateralis* que nous avons capturés en Algérie, les écailles pâles qui couvrent chaque côté du mesonotum sont plus dorées, d'après Theobald, que chez les spécimens européens.

Femelle. — La *tête* est couverte d'écailles fines, blanches et jaunâtres, et sur les côtés de la nuque seulement d'écailles plates blanches. Le rebord des orbites est marqué par des écailles blanches. Les antennes, les palpes et la trompe sont d'un noir bleu.

Les *palpes* se terminent à leur 3e article, plus grand que les autres ; il n'y a pas de 4e petit article.

Le *thorax* est brun jaune, avec des écailles courbes blanc jaunâtres. Il ne porte aucun dessin.

L'*abdomen* est noir. Chaque segment a une mince bande blanche apicale, s'élargissant sur les côtés en triangles blancs dont le sommet est dirigé vers la tête. La face inférieure de l'abdomen est entièrement blanche.

Les *pattes* sont bleu-noir, sauf à la base et à la face interne des fémurs, qui sont jaunâtres. Il y a quelques écailles blanches à l'articulation du fémur et du tibia et à celle du tibia et du métatarse. Les ongles sont égaux et simples à toutes les pattes.

Les *ailes* ne sont pas tachetées. La première cellule sous-marginale est deux fois plus longue que sa tige. Elle est plus longue et plus mince que la deuxième cellule postérieure. Celle-ci a la même longueur que sa tige. Les nervures transversales antérieure et moyenne sont sur la même ligne, la tranversale postérieure est en dedans de la moyenne à une distance de 1 fois 1/2 à 2 fois 1/2 sa propre longueur.

La longueur est de 3 mm. 1/2 à 4 mm. 1/2 sans la trompe, 5 mm. 1/2 à 6 millimètres avec la trompe.

Culex Mariæ n. sp.

Cette nouvelle espèce se caractérise par un anneau blanc à la trompe (surtout chez le mâle); les derniers articles du tarse blancs ; des anneaux blancs sur les divers segments des pattes; un mélange d'écailles blanches et noires sur les nervures des ailes, les pattes, la trompe.

Femelle. — *Tête* noire, avec de nombreuses écailles minces courbes dorées — des écailles droites bifurquées — et des écailles plates blanches, celles-ci surtout sur les côtés de la nuque. Autour des yeux, qui sont noirs, une rangée d'écailles blanches. Sur le front, noir, écailles blanches et écailles minces dorées. *Antennes* d'un brun-jaune, avec des anneaux blancs à la base et au sommet

de chaque article, ceux du sommet étant plus étroits que ceux de la base. Les *palpes* sont très courts, noirs. Le 3e article a un anneau blanc à la base et le sommet tout blanc. Il n'y a pas de 4e petit article. La *trompe*, noire, est pailletée d'écailles blanches surtout à la partie médiane, où elles forment un anneau un peu diffus.

Le *thorax*, cuivré sombre, est couvert d'écailles dorées minces, d'un petit nombre d'écailles blanches et de poils noirs. Il ne présente aucun dessin. Les *flancs*, d'un brun jaunâtre, portent des écailles blanches disposées par amas. Le *scutellum* est revêtu d'écailles dorées et blanches peu denses, et est bordé d'une rangée de poils bruns. Le *metanotum*, cuivré, est nu.

L'*abdomen* est noir. Le 1er segment est presque partout couvert d'écailles blanches disposées sans ordre, les autres segments ont une bande blanche basale peu considérable qui s'élargit en deux taches latérales triangulaires, ce qui détermine un trapèze noir apical. La face ventrale est entièrement blanche. Les poils qui se dressent au bord de chaque segment sont dorés.

Les *hanches* sont jaunâtres, couvertes par places d'écailles blanches. Les *pattes* sont noires, pailletées d'écailles blanches, sauf la face interne du fémur qui est jaunâtre. Les derniers articles du *tarse* aux 3 paires sont entièrement blancs (ceci est moins net à la 1re paire). Les autres segments des pattes ont tous un anneau blanc basal et un anneau blanc apical, sauf l'avant-dernier article tarsal des 3 paires, et l'antépénultième de la 1re paire, qui n'ont pas d'anneau apical. La formule indiquant les dents des ongles est : 1.1 — 1.1 — 1.0.

Les *ailes*, non tachetées, ont leurs nervures longitudinales revêtues d'écailles noires et blanches mêlées. La frange est blanche. La 1re cellule sous-marginale, de même longueur que la 2e postérieure, est plus étroite qu'elle, plus éloignée de la base de l'aile, et plus rapprochée de l'apex. La 1re sous-marginale a la même longueur que sa tige, la 2e postérieure est plus longue que la sienne. La nervure transversale surnuméraire (antérieure) est très courte et parfois difficile à distinguer; elle est au même niveau que la nervure moyenne. La postérieure est en arrière à une distance égale à sa propre longueur. Les haltères sont jaunâtres.

MALE. — Les *antennes*, noires brunes, avec leurs deux derniers

articles non plumeux, plus longs que les autres, sont moins longues que la *trompe*. Les *palpes* noirs sont de la même longueur que la trompe. Il y a un anneau blanc à la base de chacun des 2 derniers articles, qui ne sont presque pas renflés. Le 1er article porte à sa partie moyenne un large anneau jaunâtre, coupé par un mince anneau noirâtre autour de l'étranglement. De longs poils bruns partent de la partie terminale du 1er article et des 2 autres articles. La trompe, noire, a un large anneau blanc à sa partie moyenne. Le lobe basal de l'appareil génital externe est très long, et poilu.

La formule qui exprime le nombre de dents des ongles est : 2.1 — 1.1 — 0.0.

Dimensions: Femelle, 5 m. m. 1/2 sans la trompe, 7 1/2 avec la trompe.

Mâle, 4 m. m. à 5 1/2 sans la trompe, 5 1/2 à 7 1/2 avec la trompe.

La femelle de cette espèce, très sanguinaire, pique en plein jour.

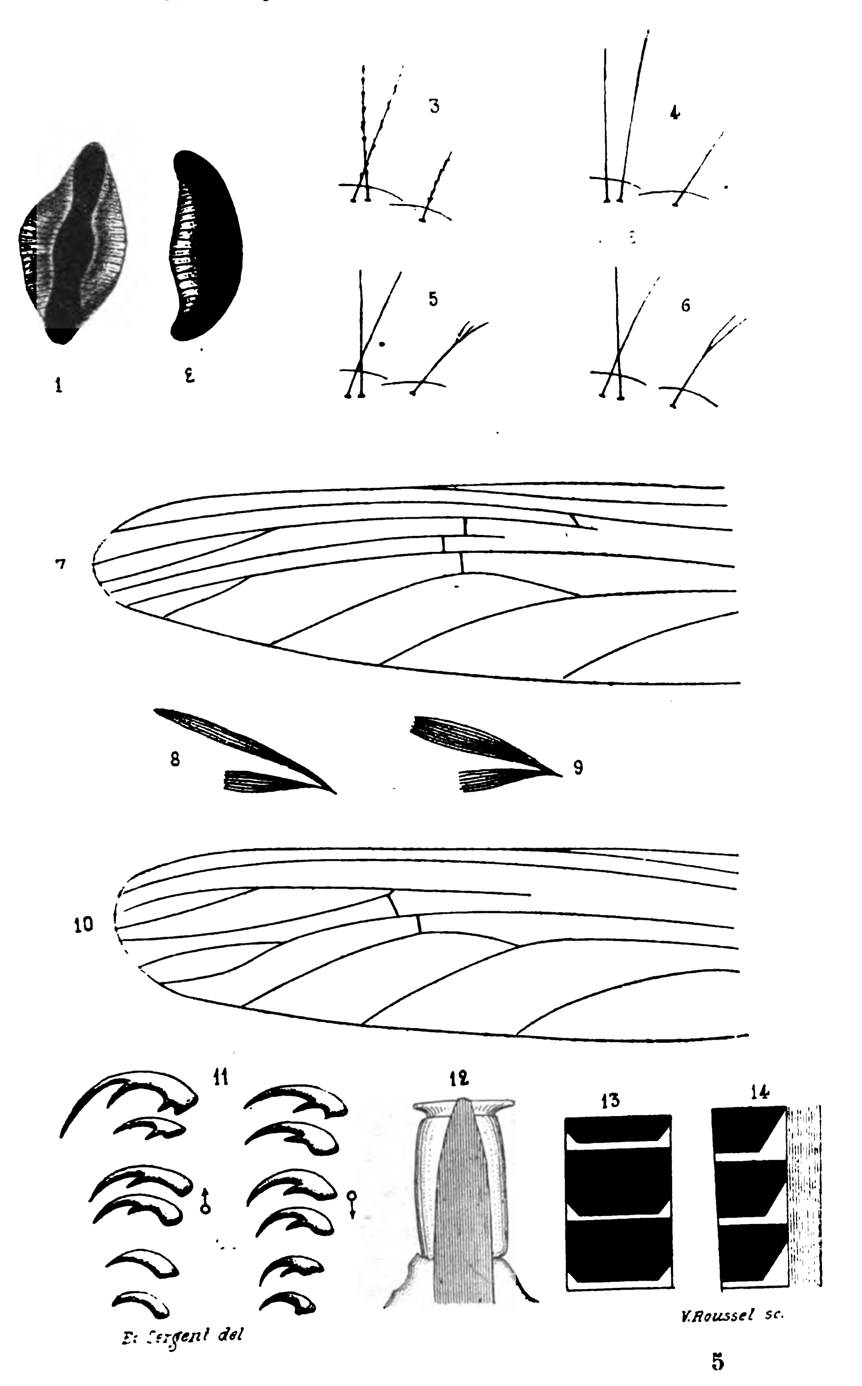
Les larves de *C. Mariæ* ont un tube respiratoire presque aussi large à son extrémité apicale qu'à sa base.

Influence des saisons. — Il n'y a, à Alger, à proprement parler, que deux saisons : l'hiver, frais et pluvieux, et l'été, chaud et sec. C'est durant cette dernière saison que pullulent les moustiques, mais ils hivernent à l'état adulte et à l'état larvaire.

On trouve toute l'année, en certains points, des larves d'*Anopheles*, de *Culex spathipalpis*, de *Culex pipiens;* et nous avons assisté, au mois de février, à la sortie de leurs nymphes de plusieurs *Anopheles*. D'après nos observations, les premières pontes de l'été ont lieu dans la première quinzaine de juin, les dernières pontes dans la première quinzaine d'octobre.

Distribution des espèces. — On peut ranger ces différents moustiques, d'après l'habitation de leurs larves, en plusieurs catégories :

1) La larve de *C. Mariæ* n'a été pêchée que dans les trous d'eau salée des falaises de calcaire cristallin. Cette eau provient des grandes lames que les tempêtes d'équinoxe jettent par-dessus les rochers de la côte, et des pluies. En été, où il ne pleut jamais, l'évaporation amène un fort degré de concentration des sels de cette eau.



5

Au mois d'août; époque à laquelle il y avait beaucoup de larves dans ces eaux, une analyse qu'a bien voulu faire faire M. G. Bertrand dans son laboratoire y révélait une proportion de 55 grammes de chlorures pour 1 litre. Au même moment, l'eau de la Méditerranée, puisée en pleine mer, contenait 34 grammes de chlorures par litre.

Ces larves vivaient donc dans une solution de chlorures presque deux fois plus concentrée que l'eau de mer.

Elles pouvaient vivre d'ailleurs dans des solutions moins fortes : les premières pluies d'octobre ayant rempli ces trous d'eau, les chlorures étant dans la proportion de 43 grammes par litre, les larves vivaient fort bien.

2) Les moustiques dont les larves ont été capturées un peu partout sont *C. pipiens* L., *C. spathipalpis*, qui se contentent des flaques d'eau les plus sales. Les larves de *C. Sergentii* et de *C. lateralis* vivent dans les mêmes conditions, mais sont beaucoup plus rares.

3) Il est une espèce que nous n'avons rencontrée que dans les villes d'Alger et de Mustapha, c'est le *Stegomyia fasciata*. Ses larves vivent dans les moindres collections d'eau citadines. Nous en avons trouvé dans les quelques gouttes d'eau qui restaient au fond d'un pot de fleurs sur un balcon, dans le pot à eau d'un cabinet de toilette.

Leurs adultes sont les moustiques les plus fréquents des appartements. Le *St. fasciata* étant considéré comme capable de transmettre le virus de la fièvre jaune, il y a lieu de retenir le fait.

4) Les larves d'*A. maculipennis*, d'*A. Algeriensis*, de *C. fatigans* ont le même habitat, où on les rencontre souvent réunies. Leurs gîtes s'échelonnent, de façon frappante, le long des vallées qui descendent du massif de la Bouzaréa, et à partir des sources mêmes (300 mètres d'altitude).

Les *Anopheles* ont été recueillis dans 13 localités sur 29, que nous avons explorées. Sur ces 13 localités possédant des *Anopheles*, 6 jouissent d'une réputation incontestée de salubrité au point de vue paludisme. Ces 6 localités sans fièvre et avec *Anopheles* sont aux altitudes respectives de 350 mètres, 300 mètres, 270 mètres, 220 mètres, 190 mètres, 150 mètres.

Les 7 localités fiévreuses et avec *Anopheles* sont aux altitudes

respectives de 180 mètres, 120 mètres, 100 mètres, 93 mètres, 20 mètres, 15 mètres, 4 mètres [1].

Conclusions. — Parmi les espèces de moustiques capturées dans les environs d'Alger, deux appartiennent au genre *Anopheles* propagateur du paludisme.

Une autre, le *Stegomyia fasciata* est l'espèce qui a été reconnue capable de transmettre la fièvre jaune.

Enfin, le *Culex fatigans* est un des moustiques qui peuvent être les hôtes dangereux de la Filaire du sang.

1. Nous remercions vivement M. le Dr Bordo, de Chéragas, pour les renseignements cliniques qu'il nous a fournis, au sujet du paludisme du Sahel algérien, question pour laquelle il a une compétence toute particulière.

EXPLICATION DES FIGURES

1. Œuf d'*Anopheles Algeriensis* (vu de face).
2. — — — (vu de profil).
3. } Différentes formes des soies médianes et angulaires de la tête des larves
4. } d'*A. Algeriensis* (dessinées d'un seul côté).
5. }
6. }
7. Aile d'*An. algeriensis*. (Schéma.)
8. Ecailles des nervures des ailes d'*An. algeriensis*.
9. Ecailles des nervures des ailes *An. bifurcatus*.
10. Aile de *Culex Mariæ*.
11. Ongles des pattes de *Culex Mariæ*, mâle et femelle.
12. Siphon respiratoire de la larve de *Culex Mariæ*.
13. Face supérieure de l'abdomem de *Culex Sergentii*, femelle.
14. Face latérale de l'abdomen du même.

RÉSUMÉ DU RAPPORT

SUR LA CAMPAGNE ANTIPALUDIQUE

organisée en 1902 à la gare de l'Alma (Est-Algérien.)

PAR MM. EDMOND SERGENT ET ÉTIENNE SERGENT

Le paludisme est, encore aujourd'hui, le principal obstacle à l'essor de la colonisation et à la mise en valeur de l'Algérie. De grands travaux de drainage ont assaini certaines régions ; mais ces ouvrages coûteux n'ont pu être exécutés que sur des points limités. D'autre part, si l'on étudie, de près, l'histoire de quelques villages, on aboutit à cette conclusion que le progrès de la civilisation n'entraîne pas toujours un abaissement dans la morbidité paludéenne. Nous connaissons des localités autrefois salubres où l'endémie palustre s'est implantée récemment, alors qu'une ère de prospérité semblait devoir récompenser les efforts des travailleurs. Cela tient sans doute à ce que le principal soin du colon, partout où il s'établit, est de se procurer de l'eau en abondance, de l'accumuler pour la saison sèche ; il crée ainsi des milieux de culture pour les larves des *Anopheles*, propagateurs du paludisme.

Il était intéressant d'expérimenter en Algérie les nouvelles mesures prophylactiques du paludisme, basées sur la défense contre les moustiques. Il fallait, pour obtenir une expérience précise, opérer sur un territoire restreint, réunissant les conditions nécessaires à l'application rigoureuse de ces mesures, et à la constatation de leurs résultats.

Grâce à M. le Dr Stéphann, médecin en chef, et à M. Mayer, directeur de la Compagnie de chemins de fer de l'Est-Algérien, que nous remercions vivement pour toutes les facilités qui nous ont été données, nous avons pu mettre en défense contre les *Anopheles* une des gares les plus éprouvées de tout le réseau par le paludisme, la gare de l'Alma, sur la ligne d'Alger à Constantine, à 38^km,600 d'Alger.

Cette gare est située dans la plaine de la Mitidja, au pied des premiers contreforts de l'Atlas, au fond de la vallée de l'oued Boudouaou, large de 600 mètres environ, que la voie traverse

perpendiculairement. Il n'y a pas de remblais, de sorte que la voie présente de chaque côté de la gare deux rampes rapides pour remonter les flancs de la vallée. Ceux-ci atteignent 30 à 35 mètres d'altitude, tandis que la gare, dans le bas-fond, est à 15 mètres seulement. La vallée est dirigée sensiblement dans la direction sud-nord, et renferme, à 1,800 mètres en amont (au sud) de la gare, le village de l'Alma; elle aboutit à la mer, à 3 ou 4 kilomètres au nord. Dans cette vallée, à 200 mètres à l'est de la gare, coule l'oued Boudouaou sur un lit de galets, sans végétation fluviale, torrent en hiver, ruisseau en été. A 300 mètres à l'ouest de la gare, et parallèlement à l'oued, a été creusé de main d'homme un canal d'irrigation, qui provient du grand barrage du Fondouck, situé à une dizaine de kilomètres en amont. Ce canal reçoit de l'eau jusqu'en octobre, époque à laquelle on ferme le barrage, mais alors les pluies surviennent. Il contient donc constamment de l'eau. Il est large de 1 à 2 mètres, d'une profondeur variant de 50 centimètres à 1 mètre. Il n'y a presque pas de courant, et il y pousse une végétation luxuriante, qui nourrit une faune très abondante. L'eau potable est apportée à la gare de l'Alma, par des trains, de la gare de Ménerville, salubre, située plus loin sur la ligne. Il y a de plus un puits non couvert chez la garde-barrière. La gare est enfouie dans un petit bois d'eucalyptus qui en ont desséché les abords immédiats. Les arbres d'autres essences sont rares dans les environs. Dans la vallée, en amont et en aval, s'étendent des cultures de céréales et des vignobles. Près de la gare s'élève une ferme isolée, habitée par la famille N.

Durant notre expérience, la gare était occupée par 13 personnes, dont 9 y étaient installées depuis plus d'un an et étaient toutes impaludées; 4 étaient arrivées durant l'hiver, n'ayant jamais eu les fièvres.

Les voisins de la gare, non compris dans l'expérience, étaient un homme d'équipe indigène qui logeait avec sa femme et ses deux enfants dans un gourbi, sorte de cahute ouverte à tous les vents. Dans le sang de ces enfants, nous avons trouvé, pendant l'été, l'hématozoaire de Laveran en dehors de tout état fébrile. Pour le moment, nous avons renoncé à essayer de défendre ces indigènes très arriérés.

La ferme dont nous avons parlé était habitée par un colon,

ancien légionnaire, sa femme et un enfant en bas âge. Un autre enfant leur naquit en été 1902, au moment de l'expérience. Ce colon refusa l'offre que nous lui fîmes d'installer chez lui les mesures de défense prises à la gare.

Il faut remarquer que ces voisins de la gare, tous paludéens, constituaient des sources d'infection inaccessibles, où les *Anopheles* pouvaient venir s'infecter.

Ces mauvaises conditions augmentaient donc les difficultés de la prophylaxie.

*
* *

Les méthodes de prophylaxie du paludisme peuvent se diviser, à l'heure actuelle, en 3 catégories :

1) Traitement préventif par la quinine des malades dont le sang contient l'hématozoaire, et qui sont ainsi des sources d'infection ;

2) Protection contre les piqûres d'*Anopheles* adultes ;

3) Destruction de ces moustiques à l'état larvaire.

1° *Traitement préventif par la quinine.* — La Compagnie de l'Est-Algérien a fait le nécessaire depuis longtemps : sur simple demande des agents, le chef de gare leur livre gratuitement de la quinine en paquets ou en comprimés. Des circulaires rappellent aux employés l'importance de cette médication.

Nous nous sommes donc occupés des deux autres modes de défense.

2° *Moyens mécaniques de protection contre les piqûres des* ANOPHELES.

A. Défense individuelle. — Les moustiquaires pour lits ne sont pas employés à cause de leur fragilité relative, qui les rend plus dangereux, une fois avariés.

Nous avons muni les agents d'un casque en moelle de sureau dont les larges bords supportent une voilette cylindrique de tulle portant deux coulisses ; la supérieure se serre autour du casque, l'inférieure sous le col rabattu du veston. Les larges bords du casque tiennent le tulle à bonne distance de la peau. Les employés ont chacun deux paires de gants de gros fil, qu'ils doivent mettre l'une sur l'autre. On leur recommande de fermer par un élastique le bas de leur pantalon.

Malheureusement, l'emploi de ces voilettes et des gants a été

fort négligé par les agents, comme nous avons pu nous en assurer.

B. Défense des habitations. — Le principe en est basé sur l'obturation de toute ouverture par une toile en fil de fer galvanisé dont la maille mesure $1^{mm},5$ de côté.

Ainsi, la porte de bois préexistante est doublée par un châssis formé d'un cadre de bois couvert de toile métallique et attaché au mur par deux charnières. Ce châssis est maintenu fermé par un ressort. Certaines portes munies d'une sorte de perron ont permis de construire un tambour, une cage de toile métallique, s'ouvrant d'un côté dans l'appartement par la porte de bois, de l'autre côté sur le dehors par un châssis comme ceux qui doublent les autres portes.

On place un cadre garni de toile métallique entre la fenêtre et le volet en le fixant avec du plâtre. Une lucarne est ménagée au milieu de la toile métallique pour permettre d'ouvrir le volet. Cette lucarne est soigneusement fermée par un châssis ressemblant en petit à ceux qui doublent les portes.

Un carré de toile métallique est collé avec du plâtre à la partie supérieure des cheminées. Il sera très facile de l'enlever pour le remplacer, lorsque la suie aura bouché les mailles.

Les chiffres suivants indiquent le résultat dû à ces mesures.

La pose des grillages eut lieu le 26 juin. En 2 visites des chambres faites avant cette date (15 et 20 juin), c'est-à-dire au moment où les moustiques sont encore rares, 11 *Anopheles* femelles furent capturées (tous dans les chambres à coucher). En 15 visites faites après la pose des grillages, du 4 juillet au 11 novembre, c'est-à-dire à l'époque où les moustiques sont le plus abondants, 10 *Anopheles* femelles seulement sont trouvés. Elles étaient toutes dans le bureau du chef de gare et la buvette, pièces ouvertes à tout instant au moment du passage des trains. Aucune ne fut capturée dans les chambres à coucher.

3° *Destruction des larves d'*ANOPHELES.

Nous nous sommes servis dans ce but du pétrole ordinaire, répandu à la surface de l'eau. Dans les environs de la gare, le principal gîte des larves d'*Anopheles* était un canal d'irrigation couvert de végétation. Nous faisions faucher ces plantes et nous versions le pétrole dans la proportion de 10 à 20 cm. par mètre carré d'eau. L'eau du canal était ensuite bien brassée

pour favoriser l'étalement du pétrole. Les pétrolages qu'on effectuait aussitôt qu'une pêche révélait la présence de jeunes larves dans l'eau ont dû être répétés toutes les trois semaines ou tous les 15 jours (au mois de septembre tous les 8 jours). Leur résultat est représenté par les chiffres suivants :

Avant la campagne, il y eut 2 pêches (20 et 22 juin), c'est-à-dire à un moment où les moustiques sont encore rares; les 2 coups de filet les plus fructueux donnèrent 25 larves ou nymphes d'*Anopheles*.

Pendant la campagne (26 juin au 11 novembre), c'est-à-dire à l'époque où les moustiques sont le plus abondants, il y eut 14 pêches : les 14 coups de filet les plus fructueux donnèrent 14 larves ou nymphes [1].

Résultat sur la santé du personnel.

La gare de l'Alma était l'une des gares du réseau le plus éprouvées par les fièvres paludéennes. Du 1er juillet 1894 au 1er décembre 1901, 9 agents ont rempli les fonctions de chef ou de sous-chef de gare. Tous y ont contractés le paludisme, dès la première année de leur séjour; 8 d'entre eux ont dû être changés de poste, « pour cause de paludisme, sur avis du médecin ». Le 9e, le chef de gare actuel, est gravement impaludé depuis la 1re année de son séjour (1898) et a eu tous les ans des accès de plus en plus violents.

Le 16 juin, date à laquelle a commencé la campagne, 13 personnes habitent la gare. Parmi elles, 9 y sont installées depuis plus d'un an et sont impaludées, 4 sont arrivées durant l'hiver 1901-1902, n'ayant jamais eu les fièvres. *Ces quatre personnes ont passé l'été et l'automne* 1902 *sans présenter aucun symptôme de paludisme.* Parmi les anciens impaludés, presque tous ont eu quelques accès, attribuables à leur infection antérieure. Le chef de gare, qui avait tous les ans son 1er accès estival vers le 1er juillet, ne l'a eu cette année que le 20 août.

Des sujets non protégés, pouvant servir de « témoins » pour notre expérience, nous sont fournis par les seuls voisins de la

1. Du 26 juin au 11 novembre, 14 pêches pratiquées dans une autre localité non pétrolée de la même région nous fournirent (aux 14 coups de filet les plus fructueux) 220 larves environ. La différence entre ces nombres de 14 larves pour l'Alma, et de 220 larves pour la localité témoin, donne une idée de l'effet du pétrolage.



gare, la famille N., qui avait refusé nos toiles métalliques. Ils entraient tous, le 15 septembre 1902, à l'hôpital de Mustapha, avec le même diagnostic : « fièvres paludéennes ».

Conclusion. — En résumé, le pétrolage du canal et la pose des toiles métalliques ont diminué d'une façon évidente le nombre d'*Anopheles*[1] trouvés dans les chambres, et, par suite, restreint le nombre des chances d'infection ou de réinfection pour les habitants de la gare.

Les quatre nouveaux venus dans la gare n'y ont pas contracté le paludisme. C'est la première fois que des personnes passent un été en ce lieu sans y prendre les fièvres.

Evidemment, c'est là une expérience restreinte, mais nous ferons remarquer qu'elle en est d'autant plus précise. Nous espérons la reprendre l'année prochaine sur une plus grande échelle, grâce à M. Mayer, directeur de la Compagnie de l'Est-Algérien, qui a décidé de faire établir dans plusieurs autres gares les moyens de défense expérimentés à l'Alma.

1. Les *Anopheles* capturés à l'Alma appartiennent à l'espèce *A. maculipennis* (Meigen) et à une espèce nouvelle *A. Algeriensis* (Theobald). Les *Culex* trouvés sont de l'espèce *C. pipiens* (Linné) ou d'une espèce nouvelle, *C. Sergentii* (Théobald) ou de l'espèce *C. fatigans* (Wiedemann).
Ces moustiques feront l'objet d'une étude spéciale.

MÉTHODE D'HYDROLYSE DES PROTOPLASMIDES

PAR M. A. ÉTARD

I

Difficultés des travaux biologiques. — La cellule vivante qui a pris un si grand rôle n'est pas une sorte d'entité, de pièce identique dont les accommodations amènent la variété dans la série des êtres. Les groupements chimiques diffèrent d'une espèce à l'autre, d'un tissu à l'autre, de l'état normal à l'état pathologique. Pour cette raison, il est nécessaire de poursuivre cette sorte de dissection chimique des tissus qui a occupé Schützemberger, puis Fischer et Kossel. Ces travaux sont dignes de tenter les chimistes. Ils sont à la vérité d'une grande difficulté.

Les produits biologiques sont des plus décevants, qu'ils viennent d'hydrolyses ou des sérums. Ce sont des sirops de bel aspect, incristallisables, indéfiniment solubles dans l'eau et tout à fait insolubles dans les solvants carbonés. Ils ne laissent pas prévoir de fractionnement possible ou d'action partielle qui les sépare. On serait en moins mauvaise posture devant un sirop limpide qui contiendrait à la fois tous les pentoses, hexoses et heptoses connus. Cela a une apparence simple, donne des réactions générales et même des analyses moyennes satisfaisantes. Il faut seulement se dire qu'il n'y a pas une solution dans l'eau, mais une multitude de solutions qui se retiennent les unes les autres, et où aucun corps n'a sa solubilité propre ni ses constantes tant qu'on ne l'a pas séparé. Il en est à peu près de même pour les réactifs qui n'ont pas d'action ou précipitent à la fois tous ces corps analogues.

Un second point nous prive d'une idée d'ensemble sur les albuminoïdes, les peptones, les sérums. C'est la fonction variable de l'être ou du tissu qui les engendre. Les spermes de poissons, les embryons végétaux, tout ce qui a une fonction temporaire à évolution rapide a permis à l'Ecole biologique allemande de découvrir des protamines et des bases hexoniques. Il se peut

qu'on retrouve ces racines chimiques dans des tissus permanents, comme on trouve tant d'autres survivances héréditaires. Mais il est douteux que cela donne une vue juste de la masse des tissus vivants en équilibre stable, tels que les tendons, les os, les muscles, etc.

II

Recherches des racines chimiques des tissus. — On a rarement tenté l'oxydation des protoplasmides, car il en revient peu de chose : la substance se détruit. Cela semble indiquer que dans la matière vivante prédominent les chaînes linéaires azotées ou oxyazotées, mais de structure analogue aux sucres qui se dévident complètement. Si à l'état initial il y avait là une proportion notable de dérivés phényliques ou pyridiques, ils ne seraient pas comburés, et apparaîtraient sous des formes substituées connues.

Pour cette raison, plus ou moins consciente, et surtout parce que cela réussit, on a fait jusqu'à présent de l'hydrolyse et comblé les points faibles des formules par de l'eau, sans toucher au substratum profond des groupes biologiques.

Toutes les hydrolyses par acides ou bases sont recommandables dans des conditions déterminées.

Depuis quelques années on a renoncé au réactif de l'inventeur de l'hydrolyse : Braconnot (1820).

L'acide sulfurique charbonnerait facilement la matière, ce qui est une preuve d'énergie, et par contradiction les ions de l'acide chlorhydrique seraient les plus forts connus. C'est là plutôt une vue de théoricien, et le chimiste qui connaît la matière choisit les ions convenables là où ils se trouvent.

Dans le domaine de chimie biologique de l'Institut Pasteur, je me suis occupé entre autres choses de la conduite des hydrolyses, et voici quelques observations sur ce sujet.

Les ions chlorhydriques ne sont peut-être pas dénués d'une perfection théorique, mais pratiquement cet acide ne se manie que dans du verre, ce qui exclut l'usage de grandes masses.

Après une hydrolyse chlorhydrique, on doit subir la présence gênante du chlore ou des chlorures. Pour les éliminer, il faut faire intervenir l'argent, qui n'enlève le chlore que dans un précipité insoluble chargé de matières d'hydrolyse entraînées, qu'il n'est plus aisé de faire revenir au jour.

L'idéal est de chasser totalement du champ d'expérience toutes les choses accessoires sans passer par des précipités insolubles.

Dans cet esprit, le plus commode est de revenir à l'hydrolyse sulfurique, convenablement étudiée. J'ai constitué un hydrolyseur avec un cylindre de tôle d'acier de 100 litres, garni d'une épaisse feuille de plomb à soudure autogène. (Fig. I.)

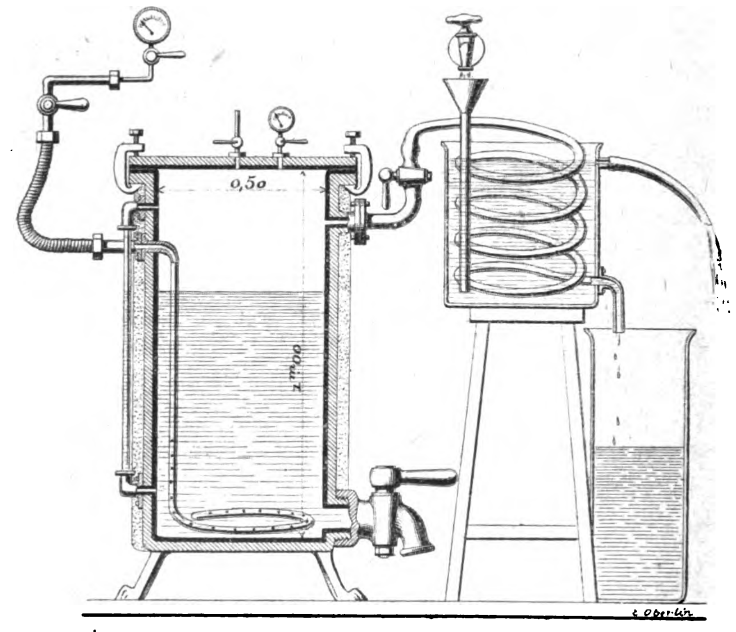


Fig. I.

Un couvercle également revêtu de plomb, serré par des serre-joints, assure l'étanchéité. La vapeur sous pression arrive par les trous d'un serpentin.

Une couche calorifuge couvre l'extérieur et permet de marcher en calorimètre à 110°. Les accessoires de niveau, de remplissage et de mesure sont représentés par le dessin ci-joint, exécuté d'après mon modèle.

En marche normale, cet appareil peut recevoir :

Muscle frais cuit et pressé 30^{k}. (Renfermant 15^{k} de sec.
Acide sulfurique à 64° B. 15^{k}.

L'état initial est donc :

Protoplasmide supposé sec. Soit en 0/0 30 0/0.
SO^4H^2 dans la masse 15^{k}. Soit en 0/0 30 0/0.
Eau servant à éteindre SO^4H^2 5^{k} + eau du tissu 40 0/0.

Le volume est alors 50 litres.

L'apport de vapeur chaude provoque la liquéfaction hydrolytique, et après 8 heures l'état final aboutit à la composition suivante :

Eau	72 0 0
SO^4H^2 0/0 dans la masse	14 0/0
Albuminoïde supposé sec (mais hydrolysé)	14 0/0

Le volume est devenu 110 litres.

En d'autres termes, la concentration en SO^4H^2 était au début de 30 0/0, elle n'est plus à la fin que 14 0/0.

Tel est le milieu hydrolisé final qu'il s'agit de traiter. Cet appareil permet d'obtenir de grandes quantités de matière transformée, déduction faite de quelques fibres non dissoutes et de la graisse facile à isoler.

L'acide sulfurique peut être éliminé exactement. Il suffirait de saturer par un excès de baryte, d'enlever à son tour la baryte par le gaz carbonique.

Mais on est loin de retrouver la matière organique engagée : une partie est définitivement perdue dans l'entraînement des précipités barytiques qui foment des laques.

Il faut éliminer les corps étrangers à l'état de cristaux solubles, se séparant purs et pouvant toujours, en cas de besoin, être redissous. Voici donc le nouveau système que j'ai employé :

La masse d'hydrolyse sulfurique finale est saturée exactement par de l'ammoniaque, filtrée et évaporée; le sulfate d'ammonium, tant qu'il s'en dépose est simplement lavé avec

ses eaux mères : il se comporte ainsi comme un sel insoluble ; grâce à ce moyen imparfait, la tyrosine et la leucine suivent au moins en très grande partie les sels impurs. Avec quelque pratique, on les séparera de là en éliminant à l'état pur le sel inutile, dont on doit retrouver le poids à titre de contrôle.

La concentration, poussée à l'état de sirop épais, laisse dans ces sirops 20 0/0 de sulfate. J'ai essayé d'enlever ce sel étranger à l'état de sulfate de nickel et d'ammonium, en ajoutant du sulfate de nickel; mais dans ces milieux extrêmement complexes, on ne peut enlever plus du tiers du sulfate ammonique, et on introduit un peu de nickel à la place.

Une réaction rapide m'a permis d'obtenir la matière organique, sinon exempte de sulfate, au moins en parfait état pour la recherche ultérieure. Il suffit de délayer le sirop sulfaté épais dans un mélange à volumes égaux d'acide acétique cristallisable et d'alcool méthylique ; aussitôt le sulfate d'ammoniaque, facile à essorer, se précipite.

C'est un avantage de localiser temporairement une grande partie de la tyrosine et de la leucine dans un dépôt soluble. Cela diminue d'autant la complexité des matériaux hydrolysés, où s'accumulent entre autres choses le glycocolle, l'acide glutamique et des bases.

Le fait d'avoir renoncé à un précipité complètement insoluble n'a que des avantages, car après ce travail préliminaire, que tous les systèmes exigent, les séparations de chimie minutieuse se font dans des conditions où le sulfate disparaît tout à fait.

Ayant déjà montré que l'hydrolyse, par les alcalis sous pression, amène les corps biologiques les mieux connus à des états limites, on ne peut employer ce procédé pour se faire une idée de la constitution des protoplasmides.

OBSERVATIONS

A porpos du mémoire de MM. TISSIER et MARTELLY

PAR M. PIERRE ACHALME

Lorsqu'en septembre dernier, je publiai dans ces *Annales* un mémoire sur les difficultés de détermination de certains microbes anaérobies, et sur l'utilité que pouvait présenter pour arriver à ce but l'étude de leurs fonctions chimiques, spécialement en ce qui concerne la fermentation des hydrates de carbone, je ne pensais pas trouver dans ce recueil même une confirmation de ces idées aussi absolue que celle que vient involontairement apporter le travail paru dans le numéro de décembre, sous la signature de MM. Tissier et Martelly.

Ces savants en effet, partis d'un point de départ différent, ont été amenés à étudier des microorganismes très voisins de ceux qui ont fait l'objet de mes recherches, et l'insuffisance de leur technique les a conduits à des confusions si évidentes qu'elles démontrent péremptoirement l'utilité du fil conducteur que j'ai cherché à dégager de dix années d'études.

Grâce à lui, il est possible de se convaincre facilement que les auteurs de ce mémoire ont décrit, sous le nom de *bacillus putrificus coli* (Bienstock), un microbe différent de celui isolé par ce savant. J'ai, en effet, opéré avec un bacille venant de Bienstock lui-même, et conservé dans la collection de l'Institut Pasteur. Ce microbe faisant fermenter d'une manière constante le glycose et le maltose, il est clair que l'on ne saurait établir, sur des caractères essentiellement instables, une identification avec cette espèce, d'un microbe ne possédant pas ces propriétés fermentatives. Le nom de *bacillus putrificus coli* (Bienstock) pourrait au contraire beaucoup mieux s'appliquer au bacille que MM. Tissier et Martelly décrivent comme nouveau sous le nom, mal choisi du reste, de *bacillus bifermentans sporogenes*, bien que l'insuffisance de l'étude en rende la détermination exacte difficile.

Je pourrais être plus affirmatif si les auteurs du mémoire précité ne s'étaient pas montrés aussi avares de détails au sujet

de la technique suivie par eux. Quoi qu'il en soit, en employant celle que j'ai décrite, ils pourront se convaincre, entre autres choses, que le bacille tétanique, en culture pure, ne se différencie nullement du *putrificus* et des autres microbes du groupe par « la sécrétion d'une diastase peu active sur les substances albuminoïdes et les protéides », mais qu'au contraire il produit une trypsine extrêmement puissante.

Je serai également désireux de connaître le procédé grâce auquel MM. Tissier et Martelly ont pu affirmer la sécrétion de lipase par les bacilles qu'ils ont étudiés. Tout en réservant la question, encore insuffisamment éclaircie, de l'action de la lipase sur les graisses, je n'ai obtenu aucun résultat par des recherches faites au moyen de la monobutyrine, et la lecture du mémoire précité ne suffit pas à convaincre — loin de là — que les auteurs se sont mis à l'abri de la cause d'erreur provenant de la saponification due à l'ammoniaque formée dans la fermentation des matières azotées.

Au sujet de la bibliographie, je ne saurais qu'exprimer mes regrets de ce que MM. Tissier et Martelly aient cru devoir prendre si tardivement connaissance de mon mémoire paru en septembre dernier. Cela leur eût épargné une erreur chronologique, qu'ils regrettent certainement, en attribuant à Fränkel la première détermination du bacille que j'ai décrit en 1891, et qui prend une importance de plus en plus grande dans la pathologie humaine, sous les noms de *bacillus emphysematosus*, *bacillus enteritidis sporogenes*, *bacillus perfringens*, etc. Cette multiplicité de noms plus sonores que significatifs, (le bacille en question ne dégageant de gaz abondants que dans certaines conditions et ayant une sporulation plutôt difficile) n'est pas faite, en effet, pour simplifier un sujet déjà assez compliqué par lui-même; aussi le but de mon mémoire était-il de lui donner un état civil définitif, en le différentiant de ses proches parents appartenant au même groupe biologique.

Sceaux. — Imprimerie Charaire.

Le Gérant : G. Masson.

17me ANNÉE JANVIER 1903. No 2

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

Epithélioses infectieuses et Epithéliomas

Par A. BORREL

La théorie psorospermique ou coccidienne du cancer a été le point de départ d'un très grand nombre de travaux; elle a eu une vogue considérable à un moment où les coccidies paraissaient être les seuls parasites capables de faire proliférer les cellules épithéliales par leur développement intra-cellulaire.

L'adénome du foie du lapin était la tumeur épithéliale type, et la coccidie oviforme le type des parasites à rechercher et à caractériser dans les tumeurs épithéliales.

Nous avons suivi dès le début, en 1890, le développement de cette théorie, critiqué successivement les figures invoquées à l'appui de la théorie parasitaire et soutenu dans un rapport au Congrès de Paris [1] (1900) que la démonstration du parasite ou des parasites du cancer restait à faire. Les psorospermies de Neisser et de Darier, les coccidies de Soudakewitch, celles de Sawtchenko, en y joignant les levures de San Felice, nous paraissaient insuffisamment caractérisées et pouvaient être expliquées par des particularités de structure et d'évolution de la cellule cancéreuse (cellules endogènes, boules muqueuses, corps à fuchsine, archoplasma et centrosomes). Parallèlement s'est développée, depuis Guarnieri, la théorie coccidienne des maladies éruptives, et, dans les cellules épithéliales des pustules de la vaccine, de la variole, etc., on a décrit des parasites dont le *Cytorictes vaccinæ* est le prototype. Là encore, la réaction de l'organisme se traduit par une multiplication des cellules épithéliales qui donne naissance à de petites tumeurs : pour les

1. *Congrès de Médecine*, Paris, 1900, section de Bactériologie. — Borrel, *Les Théories parasitaires du cancer*; ces *Annales* fév. 1901.

mêmes raisons que ci-dessus, la théorie coccidienne était toute indiquée, et elle a eu de nombreux partisans.

Certains auteurs, et Bosc[1] en particulier, ont voulu élargir la question en soutenant que les figures intra-épithéliales de la vaccine, de la variole, de la clavelée sont identiques à celles décrites comme coccidies dans le cancer, et, en se basant sur cette prétendue identité de parasites, M. Bosc a voulu créer une grande classe de *Maladies à Sporozoaires* qui comprendrait la vaccine, la variole, la clavelée, le cancer, la syphilis et sans doute bien d'autres encore.

Les Sporozoaires de la syphilis n'ont pas encore vu le jour de la publication ; nous venons de rappeler que nous avons discuté jadis les parasites du cancer; nous critiquerons dans le cours du présent travail, les Sporozoaires des maladies éruptives. Mais nous pouvons dire déjà que les éléments intra-épithéliaux des maladies éruptives n'ont de commun avec les pseudo-parasites du cancer que leur siège intra-épithélial : la morphologie en est toute différente et certainement l'origine aussi, à tel point que, même en admettant leur nature parasitaire, il faudrait en faire des parasites d'un type spécial.

D'ailleurs, pour comparer la vaccine et le cancer à ce point de vue, il serait très important d'être fixé une fois pour toutes et d'une façon précise sur les termes de la comparaison : du côté *cancer*, s'agit-il des coccidies première manière, type Neisser ou Darier, ou des coccidies de Soudakewitch, ou des coccidies-levures, type Plimmer, ou des parasites de Sawtchenko? Du côté *maladies éruptives*, s'agit-il des parasites de Guarnieri, ou des formes géantes de Funck, ou des boules chromatiques de Roger dans la variole, ou des formes que Bosc a décrites dans le sang des moutons claveleux? Il y a vraiment trop de parasites dans cette question et trop mal caractérisés : la multiplicité des travaux, le peu de précision des descriptions montrent bien que la démonstration cruciale manque et que, si parasite il y a, ce parasite est encore flou et se détache mal sur le fond des préparations microscopiques.

Pourtant les Sporozoaires sont maintenant très bien connus au point de vue zoologique : ils ont des caractères tranchés, une

1. Bosc, Les maladies à Sporozoaires, *Arch. de Médecine expérimentale;* mai 1901.

structure cellulaire fixée, une évolution déterminée qui ne laisse pas place au doute lorsqu'on les rencontre, même très petits, dans les cellules parasitées.

Avant d'affirmer la présence de Sporozoaires, il faut autre chose que des descriptions imprécises ou des dessins vagues. De plus, *il faudra dorénavant tenir compte aussi du fait expérimental, que la plupart des virus en question passent à travers les filtres.*

Que plus tard, néanmoins, la démonstration soit faite, que les virus claveleux, cancéreux, etc., appartiennent à quelque groupe de Protozoaires, à cela rien d'impossible; nous en connaissons d'assez petits pour passer à travers les filtres (*Micromonas Mesnili*[1]), mais rien, jusqu'ici, n'autorise une pareille conclusion.

Pour nous, malgré une étude attentive et minutieuse des inclusions de la vaccine, de la clavelée ou du cancer, nous n'avons pas su trouver de stades caractéristiques d'un parasite coccidien, et ce parasite restera pour nous encore très problématique; on peut même affirmer, sans craindre de se tromper, que l'immense majorité des formations intra-épithéliales décrites comme parasites représentent tout autre chose : à côté de l'hypothèse parasitaire, d'autres interprétations sont possibles.

Dans le cours de ce travail, nous comparerons les maladies éruptives, et la clavelée surtout, avec le cancer, non pas au point de vue des Sporozoaires, mais au point de vue des lésions anatomiques, et nous resterons plus près de la réalité des faits, en constatant simplement que les virus encore inconnus de ces maladies ont une action de prédilection sur le tissu épithélial, et déterminent, *dans le sens le plus large du mot,* la production de tumeurs épithéliales.

L'action du virus claveleux, à ce point de vue, est particulièrement intéressante et, dans une note à la Société de Biologie (18 janvier 1902), nous avons déjà signalé la prolifération extraordinaire des épithéliums bronchiques et des endothéliums alvéolaires dans la pustule pulmonaire. Ces nodules pulmonaires de la clavelée avaient été jusque-là peu étudiés et décrits

1. Borrel, Expériences sur la filtration du virus claveleux, *Soc. de Biologie*, 18 janvier 1902.

comme nodules broncho-pneumoniques dus à un processus particulier de pneumonie proliférative.

Ils méritent une attention toute particulière.

Dans la première partie de ce travail, nous étudierons les différentes lésions claveleuses et nous les comparerons aux lésions de la vaccine, de la variole, du molluscum contagiosum ou acné varioliforme, de la fièvre aphteuse, et même de la peste bovine. Nous serons amenés ainsi à constituer une sorte de groupement de diverses affections dans lesquelles la réaction de l'organisme vis-à-vis du virus se traduit par la prolifération des épithéliums et la formation de pustules ou même de petites tumeurs épithéliales. De ce fait, nous grouperons ces maladies sous le nom général d' ÉPITHÉLIOSES.

Nous constaterons en passant que, parmi ces épithélioses, quatre sont dues à des virus qui traversent les filtres, comme cela a été déjà démontré pour la fièvre aphteuse (Lœffler), pour la clavelée (Borrel), pour la peste bovine (Nicolle et Adil-Bey), pour le molluscum contagiosum (Marx et Sticker).

L'action de ces virus petits, sur la cellule épithéliale, dans les *Epithélioses*, permet jusqu'à un certain point de comprendre l'action du virus cancéreux dans les ÉPITHÉLIOMAS proprement dits.

L'étude expérimentale et anatomo-pathologique de l'Épithélioma de la souris sera pour nous une occasion de préciser les analogies et les différences qui existent entre l'Épithéliose claveleuse et l'Épithélioma cancéreux.

ÉPITHÉLIOSE CLAVELEUSE.

Description de la maladie.

La clavelée ou variole ovine est une maladie du mouton, et le mouton seul est sensible à l'action du virus claveleux. Par ses caractères cliniques, la maladie ressemble beaucoup à la variole humaine.

Elle peut être reproduite facilement au laboratoire par inoculation expérimentale. Les agneaux de la région parisienne sont particulièrement sensibles, et la mortalité chez les inoculés est considérable.

Si on inocule sous la peau d'un mouton, à la seringue, une

MASSON ET Cie, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, Boulevard Saint-Germain, Paris (6e)

Pr. no 323.

Vient de paraître :

LES
TUMEURS DU REIN

PAR

J. ALBARRAN
Professeur agrégé à la Faculté de médecine de Paris.

L. IMBERT
Professeur agrégé à la Faculté de médecine de Montpellier.

Un volume grand in-8° avec 106 figures dans le texte en noir et en couleurs . . . . 20 francs.

C'est une œuvre de longue haleine que MM. Albarran et Imbert présentent au public médical. Les tumeurs du rein n'ayant jamais, jusqu'à présent, été l'objet d'une étude d'ensemble, il était utile de réunir les innombrables documents épars sur la question. Les auteurs ont eu pour but de faire connaître toutes les idées nouvelles qui ont surgi dans ces dernières années et l'on pourra se convaincre qu'ils n'ont pas ménagé leurs efforts, par un simple coup d'œil jeté sur les vingt pages compactes de bibliographie qui terminent le volume. Mais là ne s'est pas borné leur ambition. Ils ont voulu faire connaître leur opinion raisonnée sur toutes les questions, de l'anatomie pathologique à la thérapeutique. Leur expérience de la chirurgie rénale, de même que l'étude attentive de très nombreuses pièces opératoires ou d'autopsie leur ont



Fig. 20. — Bourgeon cancéreux développé dans une cavité lymphatique.

permis de prendre parti et de baser leur opinion sur des preuves convaincantes; il était nécessaire pour cela de s'appuyer sur de nombreuses figures et surtout sur des dessins originaux; ils n'ont pas été ménagés.

L'ouvrage est divisé en cinq parties : la première, de beaucoup la plus importante, comporte l'étude des *tumeurs du parenchyme rénal chez l'adulte*. Elle débute par un chapitre d'anatomie pathologique et de pathogénie qui ne renferme pas moins de 210 pages. Les auteurs ont longuement étudié dans ce chapitre toutes les idées récentes, si originales, sur le mode de développement des tumeurs du rein. Les travaux relatifs à ce sujet ont été presque exclusivement publiés en Allemagne, aussi sont-ils à peu près inconnus en France et faut-il remercier MM. Albarran et Imbert de nous les avoir fait connaître. On y trouvera, en particulier, l'étude de la doctrine de Grawitz sur le rôle des fragments aberrants des capsules surrénales; une discussion sur le point de départ des tumeurs dites angiosarcomes; et enfin l'exposé, d'après les travaux les plus récents, du mode de développement de ces curieuses tumeurs mixtes si fréquentes chez les enfants et auxquelles on donne actuellement le nom impropre de sarcomes. Les chapitres suivants sont consacrés aux symptômes et au diagnostic : nous y signalerons surtout une étude très complète de la fonction urinaire d'après l'épreuve du bleu de méthylène, la cryoscopie, le cathétérisme urétral, les séparateurs, etc. Enfin, le chapitre du traitement a été l'objet d'une attention particulière. Les auteurs donnent d'abord le manuel opératoire de la néphrectomie par la voie lombaire et par la voie abdominale avec les modifications proposées par divers chirurgiens; ils insistent ensuite sur les accidents, quelques-uns fort redoutables, qui peuvent survenir au cours de l'intervention, déchirure du pédicule, de la veine cave, etc., et consacrent un long paragraphe à l'étude des indications opératoires.



Fig. 15. — Epithélioma de l'extrémité supérieure du rein avec des noyaux plus petits disséminés dans le parenchyme (Autopsie, février 1890, hôpital Necker).

Après avoir exposé la gravité réelle de l'opération suivant les diverses

conditions cliniques, anatomiques ou opératoires de la tumeur, ils étudient, d'après une statistique très étendue, les résultats éloignés de la néphrectomie. Les auteurs ayant réuni 410 cas de tumeurs du rein, lesquels ont été mis en tableaux à la fin du volume, cette statistique, la plus importante de beaucoup qui ait paru jusqu'à présent, leur permet de défendre la néphrectomie et d'en apprécier les résultats avec plus de faveur qu'on ne le fait généralement.

La deuxième partie comprend les *tumeurs du rein chez l'enfant*. Là encore les auteurs ont voulu faire une œuvre personnelle. Ils ont réuni

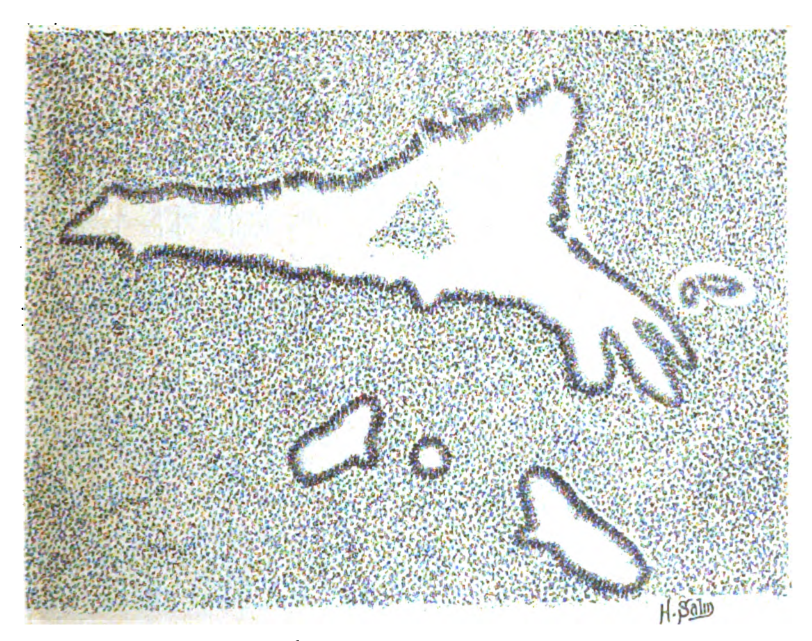


Fig. 92. — Adénome papillaire de l'uretère. Extirpation par Albarran.

un grand nombre d'observations et c'est d'après elles qu'ils ont fait le tableau de la maladie. Contrairement à ce qui se passe pour bien des ouvrages classiques, cette partie du livre n'est pas un simple résumé du chapitre des tumeurs du rein chez l'adulte.

La troisième partie est consacrée aux *néoplasmes primitifs du bassinet et de l'uretère*; cette étude n'est pas simplement la reproduction du travail publié récemment par l'un des auteurs. Elle a été écrite complètement à nouveau.

La quatrième partie, les *kystes du rein*, comprend les kystes des néphrites, les grands kystes séreux et le rein polykystique. Ici encore les statistiques opératoires permettent aux auteurs de donner des conclusions qui sont dès à présent basées sur un assez grand nombre de faits pour pouvoir être considérées comme définitives; ils ont

pu trouver, en effet, cinquante-deux cas de reins polykystiques opérés. Mentionnons à ce propos un chapitre spécialement consacré au rein polykystique de l'enfant qui n'est ni celui du nouveau-né, ni celui de l'adulte; les exemples en sont maintenant assez nombreux pour justifier cette innovation.

Enfin, dans la dernière partie, MM. Albarran et Imbert ont fait l'étude des *tumeurs paranéphrétiques* dont ils ont réuni soixante et onze cas.

La courte analyse que nous venons de donner de cet important ouvrage suffira à montrer que les auteurs ont eu, avec le souci d'être complet, celui de fixer l'état réel de nos connaissances actuelles sur les tumeurs du rein.

Paris. — L. Maretheux, imprimeur, 1, rue Cassette. — 3918.

goutte de sérosité claveleuse, on constate, après une période d'incubation de 4 jours en moyenne, une infiltration du tissu sous-épidermique, marquée bientôt par une tache rouge vineuse qui s'étale rapidement sur la surface cutanée; la température s'élève en même temps et tout d'un coup, à 41°, 41°-5. La pustule d'inoculation se développe et atteint quelquefois des dimensions considérables; le tissu épithélial est épaissi, le derme infiltré et le tout constitue une grosse induration proéminente; les limites de la pustule sont nettement marquées, régulièrement circulaires.

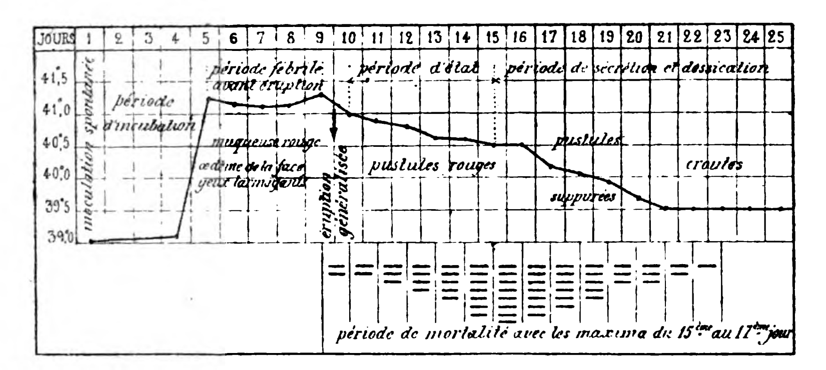
Pendant la première semaine, la pustule est en voie d'évolution, d'aspect chaud, congestif, correspondant à une période de prolifération du tissu épidermique; puis elle paraît se flétrir : une ombilication centrale apparaît, la surface s'affaisse, prend un aspect blanchâtre, purulent, une ulcération se produit, correspondant à une vacuolisation et une nécrose du tissu épithélial; l'aspect devient gangreneux, noirâtre, et la guérison se fait lentement, si entre temps, la généralisation de la maladie n'entraîne pas la mort de l'animal.

En effet, très souvent, vers le 9e, 10e jour après l'inoculation, des pustules de généralisation apparaissent sur tout le corps, discrètes ou confluentes, suivant la gravité de la maladie. La température depuis le 4e jour est restée élevée, l'animal a des symptômes généraux, il est triste, mange peu ou pas du tout, le museau est œdématié, les muqueuses rouges, les yeux larmoyants; l'éruption généralisée amène une détente et une légère rémission de la température. Souvent, la mort arrive avant l'éruption ou dans les 1ers jours qui suivent cette éruption, du 9e au 16e jour de la maladie.

L'éruption secondaire a des sièges de prédilection : le museau, la vulve, l'anus: d'une façon générale, les muqueuses ou les régions à peau fine, aisselle, aine, etc.

Ces pustules de généralisation sont plus petites que la pustule d'inoculation, elles atteignent rarement les dimensions d'une pièce de deux francs, l'évolution en est très régulière, passant par des périodes de floraison, de sécrétion, de dessiccation et de guérison.

Le schéma suivant montre la marche normale et très ordinaire de la maladie expérimentale.



Du 10e au 23e jour, la mortalité s'échelonne, avec un maximum vers les 14e, 15e et 16e jours.

Après 24, 25 jours, et à moins de complications secondaires, la guérison peut être considérée comme certaine.

Lésions à l'autopsie.

A l'autopsie d'un mouton mort vers le 15e jour, on trouve des lésions généralisées à presque tous les organes.

Le ganglion correspondant au point d'inoculation est toujours très gros, comme dans la vaccine, chez la génisse. Les lésions profondes portent surtout sur le poumon et sont tout à fait caractéristiques.

Le tissu pulmonaire est parsemé de nodules durs, hyalins, denses, très variables comme dimensions, presque toujours nettement circulaires, avec une petite tache centrale opaque, entourée d'une zone hyaline qui se détache à l'emporte-pièce sur le tissu aéré du poumon; on les a comparés à des grains de sagou. Cet aspect est surtout dû à un épaississement marqué de la plèvre au niveau de la petite tumeur.

Les tumeurs pulmonaires isolées atteignent parfois 1 centimètre de diamètre, souvent elles sont confluentes et, dans certains cas, le processus est tel qu'un lobe entier du poumon est transformé en un tissu *carnifié*, dense, rougeâtre, d'une consistance qui rappelle presque celle du tissu hépatique.

Dans la cavité abdominale, l'estomac est presque toujours farci de pustules, sous forme de taches rondes, régulières, de la dimension d'une lentille, blanchâtres et opaques sur le fond transparent et bleuté des parois du rumen.

Souvent, ces pustules sont confluentes.

Plusieurs fois, le pancréas s'est montré tapissé de pustules claveleuses, sous forme de petites pendeloques appendues au tissu de la glande.

Les lésions du foie sont moins apparentes et les pustules sont généralement très petites, à peine comme des points nacrés, visibles surtout à cause de l'épaississement de la capsule au niveau de la lésion. Les lésions profondes et les pustules profondes dans le tissu hépatique peuvent passer inaperçues à l'examen macroscopique; elles sont reconnaissables à l'examen microscopique.

Le rein est presque toujours atteint et montre aussi des lésions sous forme de taches opaques dans la couche corticale ou de petits pseudo-tubercules translucides, visibles sur la tranche à la section.

Les ganglions mésentériques et, d'une façon générale, tous les ganglions de la cavité abdominale sont hypertrophiés; presque toujours on peut noter une apparition de petits ganglions, rappelant par leur aspect rougeâtre le tissu splénique.

Ni la rate, ni les ganglions ne montrent de lésions pustuleuses.

Étude anatomo-pathologique des lésions. Claveau.

Au niveau des pustules claveleuses développées sur la peau, le derme est infiltré et rempli d'une sérosité virulente, qu'on a désignée sous le nom de « claveau ».

On peut recueillir des quantités notables de claveau en saisissant une pustule entre les mors d'une grande pince à forcipressure, et en ponctionnant avec une pipette stérilisée. Le liquide qui monte par pression dans la pipette est d'une transparence parfaite, il est filant, visqueux, épais, rapidement coagulé.

Ce liquide est très virulent et reste virulent malgré des dilutions considérables.

Son étude, au point de vue microscopique, doit être faite tout d'abord. L'examen à l'état frais montre des cellules très spéciales, sur lesquelles nous avons particulièrement appelé l'attention (*Société de Biologie*, 18 janvier 1902) et qui sont tout à fait caractéristiques des lésions claveleuses. Ce sont de grands éléments d'origine mésodermique, de grands macrophages mesurant jusqu'à 40 et 50 μ, à noyau vacuolisé, et contenant à côté du noyau des corps granuleux facilement visibles dans le

protoplasma. Ces cellules sont constantes dans toutes les localisations du virus claveleux; elles méritent bien le nom de CELLULES CLAVELEUSES : on ne les retrouve ni dans la vaccine, ni dans la variole, ni dans les autres épithélioses que nous étudierons dans le cours de ce travail, et dont les lésions sont pourtant très semblables aux lésions claveleuses.

Il était tout naturel de rechercher, dans ces cellules si spécifiques, le parasite de la clavelée, et l'inclusion para-nucléaire se présente tout d'abord à l'observation microscopique.

Les conditions d'étude sont parfaites : le claveau, facile à recueillir, peut être examiné vivant, à l'état frais; les cellules claveleuses sont en grand nombre, l'étude des inclusions peut être poursuivie pendant des heures, en goutte pendante, en chambre humide, à toutes les températures; jamais nous n'avons pu observer une apparence de vie ou de mobilité quelconque des éléments en question.

On peut, sur une même préparation, voir successivement un très grand nombre d'inclusions à l'état vivant; jamais nous n'avons pu noter une évolution quelconque ou un ensemble de stades qui puissent faire songer à un parasite appartenant aux groupes connus des Sporozoaires.

C'est toujours le même aspect granuleux, amorphe, quelconque, ressemblant vaguement à un corps amœbiforme, mais figé dans sa forme. L'inclusion, plus réfringente, se distingue toujours très bien dans le protoplasma de la cellule claveleuse. Souvent, la partie centrale de l'inclusion présente une ou plusieurs vacuoles qui rappellent plutôt un noyau de polynucléaire vidé; nous retrouverons le même aspect sur les préparations colorées.

Quelquefois, l'inclusion est de grandes dimensions, presque égale au noyau de la cellule, à bords irréguliers, dentelés; dans d'autres cas, elle est plus petite ou formée de 3 ou 4 petites masses réunies par de fins tractus; jamais nous n'avons pu observer de mouvements de condensation des différents corps.

S'il s'agit d'un parasite, il faut admettre non pas un Sporozoaire, mais un être dont l'aspect rappellerait un vague plasmode immobilisé, dès que sorti de l'organisme du mouton.

Nous avons étudié ces cellules sur des préparations fixées et colorées, et nous avons varié autant que possible les méthodes

de fixation et de coloration employées pour l'étude cytologique des éléments cellulaires et des parasites protozoaires.

A ce dernier point de vue, la méthode de Laveran mérite d'être mise en première ligne : elle a permis de mettre en évidence, dans des parasites jusque-là mal étudiés, les plus fins détails de la structure cellulaire; nous l'avons appliquée à l'étude du claveau récemment recueilli. Le claveau est étalé sur lame en couche mince et fixé par l'alcool absolu une demi-heure; la préparation est ensuite colorée par le mélange éosine-bleu à l'argent, passée au tannin, lavée, séchée, examinée.

La méthode montre admirablement les grandes cellules claveleuses avec le noyau vacuolisé, coloré en violet foncé; autour du noyau, une zone de protoplasma granuleux, plus coloré que le protoplasma périphérique et en bleu pur. Dans le protoplasma est logée l'inclusion para-nucléaire : celle-ci montre un aspect réticulé qui est figuré exactement dans les dessins, planche V, figure 1,-2,-3; elle n'est pas contenue dans une vacuole, elle est colorée par l'éosine; elle présente, au centre, 2, 3 ou 4 apparences vacuolaires prenant mal la couleur et rappelant, seulement par la forme, un noyau de polynucléaire.

Tantôt l'inclusion colorée par l'éosine est unique, rassemblée en une seule masse, tantôt elle paraît avoir des satellites, elle est rattachée par des tractus très fins à des masses secondaires qui présentent la même réaction colorante : figure 2, planche V.

L'examen de multiples préparations ne nous a jamais montré autre chose, jamais nous n'avons pu voir un indice de noyau ou de corps chromatique caractéristique d'un noyau de protozoaire.

Au contraire, la réaction éosinophile de l'inclusion doit faire penser plutôt à quelque substance intra-cellulaire en voie de résorption, et nous retrouverons dans le cours de cette étude de multiples raisons morphologiques pour penser qu'il s'agit de leucocytes ayant pénétré dans la cellule ou ayant été phagocytés par elle. D'autres méthodes de fixation et de coloration n'ont pas modifié cette opinion.

J'ai employé le fixateur suivant :

Ac. osmique	2
Ac. chromique	3
Chl. de platine	2
Ac. acétique	20
Eau	350

Pour réussir des préparations de frottis avec la fixation que j'indique ici, il est nécessaire de prendre quelques précautions, applicables d'une façon générale à toutes les préparations par frottis.

Le claveau, étalé en couche mince, doit être *fixé avant dessiccation*, si l'on veut ensuite pouvoir colorer électivement par la méthode rouge Magenta, picro-indigo-carmin.

Si l'on plonge dans le fixateur et sans autres précautions la lame sur laquelle on a étalé la goutte de claveau, il arrive presque toujours que la pellicule étalée se détache tout entière : elle n'adhère pas à la lame.

Pour obvier à cet inconvénient, on peut attendre une demi dessiccation, ou bien, ce qui est mieux, après avoir étalé en couche mince et avant toute dessiccation, on passe rapidement la lame dans une solution de tannin à 5 0/0 qui produit instantanément l'adhérence de la pellicule, et, tout de suite après, on verse le fixateur sur la lame; il se produit un léger précipité de tannate d'osmium, que l'on entraîne par un excès de fixateur : ce précipité est d'autant plus faible qu'on a moins laissé agir le tannin; il gêne d'ailleurs très peu l'examen ultérieur.

Ce désavantage est compensé par le brillant et la précision des colorations que l'on obtient : le passage rapide dans le tannin ne nuit d'aucune façon à la bonne fixation.

Fixer une heure environ, lavage à l'eau ; coloration par la méthode déjà indiquée.

L'aspect des cellules claveleuses par cette méthode est tout différent de celui que donne la méthode de Laveran, et les figures 4, 5, planche V, montrent les résultats.

Toutes les cellules pseudo-parasitées présentent à peu de chose près la même structure : un noyau nettement vacuolisé et, à côté du noyau, une inclusion colorée en brun foncé, se détachant sur le protoplasma plus clair de la cellule. Dans l'inclusion, des boules chromatiques, rouges, de dimensions variées, irrégulières, éparses dans la masse de l'inclusion, ou périphériques, souvent appendues en forme de *gouttes bataviques* sur des prolongements de la masse brune centrale.

L'aspect de ces inclusions très irrégulières, sans symétrie aucune, sans noyau défini, ne plaide pas non plus en faveur d'un être vivant. Nous les retrouverons sur les coupes de

pustules claveleuses fixées et colorées par la même méthode, non seulement dans les cellules claveleuses mésodermiques, mais aussi dans les cellules ectodermiques, dans les cellules glandulaires; nous pourrons sur coupes les comparer aux corps intra-épitheliaux de la vaccine ou de la variole.

En dehors de ces grandes cellules claveleuses, dans le claveau, se trouvent en plus ou moins grand nombre, suivant le moment de la récolte, des leucocytes polynucléaires et des débris de leucocytes qui, en dégénérant, prennent les aspects les plus variés.

Les leucocytes du mouton sont assez particuliers, le noyau est généralement multilobé, mais, dans certains cas, il est formé par une série de petits noyaux en forme de vésicules tout à fait distinctes, rondes ou piriformes : le leucocyte est polynucléé au sens propre du mot.

Au point de vue bactériologique, malgré l'emploi de multiples méthodes de coloration, rien d'intéressant n'a pu être noté.

Pustule cutanée d'inoculation.

Pour l'étude microscopique et sur coupes des lésions claveleuses, j'ai toujours utilisé des pièces prélevées vivantes, par biopsie ou sur des animaux sacrifiés, de façon à avoir une fixation aussi parfaite que possible, et j'ai suivi, dans cette étude, la technique employée pour l'étude des pseudo-parasites du cancer. (Ces *Annales*, fév. 1901.)

J'ai pu ainsi comparer d'une façon très exacte les résultats obtenus dans l'étude du cancer à ceux fournis par l'étude de la clavelée et des autres épithélioses.

A la fin du 3e jour, lorsqu'on a inoculé à la seringue une goutte de sérosité claveleuse sous la peau du mouton, on constate une infiltration œdémateuse dans le tissu sous-épidermique; l'épithélium malpighien paraît normal, tandis que déjà les coupes montrent quelques cellules claveleuses mésodermiques et une infiltration du tissu par des leucocytes polynucléaires.

Vingt-quatre heures après, la tache rouge superficielle apparaît, et les coupes montrent, en même temps qu'une infiltration plus notable du tissu sous épidermique, des modifications dans le tissu épithélial malpighien.

Les modifications apparaissent d'abord dans la zone moyenne du réseau malpighien; on note quelques figures de division, les cellules paraissent s'hypertrophier, la zone épithéliale intéressée montre des assises cellulaires plus nombreuses, et la pustule est déjà indiquée.

Dans les cellules les plus superficielles, des gouttes éléidiniques se forment en plus grande abondance; certaines cellules en sont bourrées. Par leur aspect, ces gouttes chromatiques pourraient en imposer pour des corps étrangers à la cellule; leurs dimensions sont très variées, depuis 1μ jusqu'à 6 et 7μ; elles gardent énergiquement les matières colorantes.

C'est seulement vers le 8e jour que la lésion claveleuse est complètement établie, et la figure 1, planche I, représente la coupe d'une pustule cutanée, avant la vésiculisation, lorsque la pustule a encore cet aspect congestif et chaud que nous avons décrit.

De la surface vers la profondeur, on trouve d'abord les strates épithéliales d'aspect corné en voie d'exfoliation; la portion de la coupe qui a été dessinée montre une sorte d'invagination des squames épidermiques fortement colorées en rouge; cet aspect est dû à ce que la coupe intéresse la portion périphérique d'un follicule laineux.

Immédiatement au-dessous, on rencontre plusieurs assises de grandes cellules très hypertrophiées, encore vivantes, mais vacuolaires; la structure filamenteuse du protoplasma malpighien n'est plus reconnaissable : la vésiculisation de la pustule est proche. Toutes ces cellules contiennent en abondance des gouttes de structure homogène, colorées soit par le rouge Magenta, soit par l'acide picrique (lorsque la décoloration est poussée trop loin) : elles sont d'origine éléidinique et ne peuvent, en aucune façon, être interprétées comme éléments parasitaires; leurs dimensions varient à l'infini, comme le montre la figure 1, planche I *a*,*a*.

Nous trouverons cette lésion cellulaire dans toutes les maladies pustuleuses; elle domine dans la pustule variolique.

Cette zone des grandes cellules vacuolisées va en se développant et s'étend de plus en plus jusqu'à fonte cellulaire complète, lorsque la pustule s'ombilique et arrive à la période de sécrétion.

Plus profondément, la figure 1, planche I, montre des assises cellulaires dans lesquelles la structure filamenteuse du protoplasma est conservée; il n'est pas rare de voir des cellules invaginées, des imbrications cellulaires, des cellules enkystées dont l'aspect répond aux descriptions qui avaient été données jadis des coccidies type Darier-Wickham (fig. 1 *b*.)

Enfin, les couches les plus profondes et les cellules basales de l'épithélium contiennent toutes ou presque toutes des inclusions logées dans le protoplasma cellulaire et souvent dans une vacuole périnucléaire. Le noyau de la cellule a l'aspect particulier caractéristique du processus claveleux : il est vacuolaire. Les inclusions sont colorées en brun, elles renferment des grains chromatiques irréguliers, et leur description correspond exactement à celle que j'ai déjà donnée des inclusions vues sur les frottis, dans les grandes cellules mésodermiques du claveau.

La figure 1 *b* montre que les cellules glandulaires ont les mêmes inclusions et que leur noyau est aussi vacuolisé. Dans le tissu conjonctif interstitiel et profondément dans le derme, abondent les grandes cellules claveleuses mésodermiques.

Il est certain que, dans ces différents cas, le processus est le même; les inclusions sont de même nature, dans les cellules ectodermiques et mésodermiques.

Cette diversité d'habitat du parasite hypothétique plaide contre l'interprétation parasitaire; les types de sporozoaires capables de vivre dans des cellules d'origines diverses sont plutôt rares. On ne connaît guère que l'*Adelea Mesnili* de Ch. Pérez, qui parasite des tissus de nature diverse chez un lépidoptère, et le *Cyclospora karyolytica* de Schaudinn, qui parasite non seulement les noyaux des cellules épithéliales de l'intestin de la taupe, mais encore ceux des cellules conjonctives et des leucocytes de la paroi.

L'examen des préparations nous éloigne encore davantage de cette interprétation, et les arguments en sa faveur ne nous ont pas convaincu. En attendant démonstration meilleure, l'hypothèse de leucocytes intra-cellulaires nous paraît beaucoup plus probable et plus admissible; nous la garderons jusqu'à preuve contraire, en reconnaissant que la preuve absolue manque, et que la discussion sur le terrain morpholo-

gique pourrait rester indéfiniment ouverte et devenir oiseuse.

Ces éléments dans la clavelée sont l'analogue des corpuscules de Guarnieri dans la vaccine, nous aurons encore à y revenir. Mais ils n'ont aucun rapport avec les figures décrites dans le cancer comme parasites; celles-ci ont une tout autre origine.

Pustule stomacale.

Les parois de l'estomac chez un mouton atteint de clavelée généralisée présentent des pustules nombreuses.

Les coupes montrent sur la surface épithéliale de petites tumeurs entièrement constituées par la prolifération des cellules épithéliales à type ectodermique et malpighien; les figures de karyokinèse sont en grand nombre; autour de centres nombreux se constituent de véritables globes épidermiques; les cellules invaginées, kystiques, identiques aux cellules jadis décrites dans les cancers épithéliaux comme coccidies (type Darier-Wickham), sont très abondantes, et donnent au tissu un aspect épithéliomateux qui mérite d'être signalé.

Des inclusions sont visibles dans les cellules épithéliales et dans les cellules mésodermiques sous-jacentes.

Lésions pulmonaires.

Au point de vue qui nous occupe surtout, les lésions pulmonaires de la clavelée sont particulièrement intéressantes. Les nodules hyalins caractéristiques sont superficiels ou profonds, sous-pleuraux, ou péribronchiques ou épars dans tout le parenchyme; parfois, la lésion est diffuse et peut envahir un lobe entier du poumon.

Dans la plupart des cas, la tumeur claveleuse a pour centre une bronche ou une bronchiole dont l'épithélium, rempli de cellules en voie de karyokinèse, a surabondamment proliféré : les ramifications de l'épithélium bronchique s'étendent dans tous les sens et pénètrent radiairement la tumeur; la figure 2, planche I, montre une portion de la coupe d'une pareille tumeur; le type des cellules endothéliales alvéolaires est complètement modifié, et le poumon, à la coupe, paraît avoir repris le type embryonnaire; de véritables acini se trouvent constitués

et tapissés d'un épithélium cubique. Deux hypothèses sont possibles : ou bien l'endothélium préexistant a repris, sous l'influence du virus, le type cubique, ou bien cet endothélium a éte remplacé par un véritable épithélium d'origine bronchique.

Dans cette dernière hypothèse, qui me paraît la plus probable, l'épithélium bronchique, par son développement exagéré sous l'influence du virus claveleux, se comporterait comme un tissu envahissant de proche en proche et se moulant sur les parois alvéolaires préexistantes.

Le dessin montre que le schéma de la structure alvéolaire est conservé, la circulation se fait d'une façon presque normale.

La réaction épithéliale proliférative est de toute évidence. — Dans le tissu interstitiel, sont éparses les cellules claveleuses, (pl. II, *fig*. 2. *a a*) avec noyau vacuolaire et inclusions caractéristiques. Il n'y a pas d'inclusions dans l'épithélium alvéolaire, pas plus que dans l'épithélium bronchique, parce qu'il s'agit d'un nodule claveleux périphérique, développé autour d'une bronchiole terminale.

Dans le cas de pustule profonde et lorsque la lésion claveleuse intéresse une grosse bronche, l'aspect est tout autre, comme cela a été figuré (pl. VI, *fig*. 1).

Dans la figure dessinée, prise en pleine lésion claveleuse au point de jonction d'une grosse bronche avec une bronchiole secondaire, on remarque une structure très différente des deux épithéliums.

En A, les cellules proliférées de la grande bronche rappellent le type ectodermique à protoplasma presque filamenteux; les assises cellulaires sont très nombreuses.

En B, l'épithélium est régulièrement cylindrique, de type endodermique, le protoplasma est rempli de petites granulations chromatiques, il a conservé la structure normale.

Dans le premier cas, et seulement dans les cellules à type ectodermique, on trouve des inclusions cellulaires, le noyau a pris le type vacuolaire si souvent signalé.

Ici, les inclusions se rapprochent du type Guarnieri dans la vaccine; elles sont beaucoup plus petites que les inclusions que nous avons décrites jusqu'ici dans la clavelée. Toutes les assises cellulaires sont manifestement infiltrées de leucocytes polynucléaires qui circulent entre les cellules épithéliales. Les réactions

colorantes et l'aspect des leucocytes extra-cellulaires sont identiques aux réactions colorantes et à l'aspect des corps intracellulaires.

Les inclusions sont de petites dimensions, elles paraissent correspondre à des fragments de leucocytes qui auraient pénétré dans les cellules épithéliales; le processus de pénétration est très évident sur cette coupe.

Dans l'épithélium cubique de la bronche secondaire, les noyaux ne sont pas vacuolisés, il n'y a pas d'inclusion.

Le dessin montre dans le tissu péribronchique quelques cellules claveleuses typiques.

Nodules claveleux sous-pleuraux. — Les nodules claveleux superficiels sous-pleuraux sont très propices pour l'examen histologique; ils sont faciles à prélever en tranches minces, la fixation des couches superficielles se fait très rapidement, et, au niveau de la plèvre épaissie, à cause de la simplicité du tissu et de son excellente fixation, les plus fins détails de structure peuvent être étudiés.

Sur des coupes tangentielles, dans le tissu pleural œdématié, immédiatement au contact des alvéoles à épithélium cubique, on peut étudier le processus claveleux dans sa plus grande simplicité. Ce tissu est d'une transparence remarquable, il se prête admirablement à l'étude des moindres granulations visibles au microscope.

J'ai dessiné (pl. V, *fig.* 11) la coupe d'une pustule pulmonaire sous-pleurale, chez un animal sacrifié au 15e jour de la maladie.

En A, l'épithélium alvéolaire et au-dessous le tissu pleural œdématié. Les cellules claveleuses (*b b'*), avec noyau vacuolisé et inclusions pseudo-parasitaires, y sont très abondantes; des leucocytes polynucléaires infiltrent le tissu, il y a là un processus inflammatoire très évident.

Je désire appeler l'attention des microscopistes sur des granulations très fines éparses dans le tissu, comme cela a été figuré très exactement dans le dessin.

Ces granulations très bien définies, brillantes, sont très petites; la dimension exacte est donnée par la comparaison avec le centrosome d'un leucocyte mononucléaire (*c*), qui se trouvait dans la préparation à ce niveau; elles sont de moitié plus petites, et n'ont certainement pas 1/4 μ. : isolées, en diplocoques, en chaî-

gettes, en amas plus ou moins nombreux, éparses dans le tissu, abondantes surtout dans les points où les cellules claveleuses se rencontrent en grand nombre.

L'examen des préparations est à priori en faveur de bactéries, de microcoques très fins qui seraient l'agent virulent et la cause des processus claveleux; en faveur de cette hypothèse plaide le lieu où ces granulations abondent dans les endroits où les cellules claveleuses sont les plus nombreuses, en plein foyer inflammatoire, exactement au niveau de la prolifération épithéliale.

Il est peu probable qu'il s'agisse de granulations d'origine cellulaire, analogues, par exemple, aux granulations, des *Mastzellen*, mais beaucoup plus fines. Il faudrait admettre, dans ce cas, que des cellules bourrées de granulations, trop petites pour avoir encore été décrites, s'émiettent à la façon des clasmatocytes et envoient dans le tissu œdématié des prolongements très longs et très fins; elles laisseraient dans les interstices cellulaires les granulations dont il est question, simulant des microbes très fins pour induire en erreur les bactériologistes.

D'ailleurs, même en admettant que ces éléments soient réellement d'origine microbienne, ce qui est très probable, on n'est pas en droit de conclure d'une façon définitive à leur rôle causal dans le processus claveleux; peut-être s'agit il simplement de microbes d'infection secondaire. Je les ai pourtant trouvés plusieurs fois dans les coupes de pustules pulmonaires, sur des animaux sacrifiés.

Je les ai trouvés aussi dans les pustules du foie, au niveau de la capsule de Glisson épaissie, toujours sur des coupes tangentielles et superficielles, en suivant les techniques de fixation et de coloration que j'ai indiquées.

La figure 10, pl. V, montre les lésions claveleuses de la capsule de Glisson, au niveau d'une pustule hépatique. Dans le tissu capsulaire épaissi, œdématié, les cellules fixes sont largement étalées, le tissu fibrillaire est d'une pureté et d'une transparence parfaites, on voit quelques macrophages avec des inclusions Celles-ci abondent dans les mononucléaires à noyau vacuolisé et ici, plus que partout ailleurs, la vraie nature de ces inclusions paraît de toute évidence : on voit souvent des leucocytes *intracellulaires parfaitement reconnaissables*.

Les granulations brillantes, très chromatiques, sont éparses

dans tout le tissu; elles sont à la limite de la visibilité, et elles sont pourtant très visibles à cause de leur coloration intense qui les distingue de granulations quelconques; on en trouve quelquefois dans le protoplasma étalé des macrophages.

La figure 9, pl. V, a été dessinée avec une exactitude absolue, à un grossissement de 3,000 diamètres. (Apoch. Zeiss 1,5m ocul. 18).

Pourquoi, dans les séreuses, ces éléments sont-ils visibles et pourquoi ne les retrouve-t-on pas dans la profondeur des pustules cutanées. Je les ai cherchés en vain dans toutes les autres localisations du processus claveleux.

Le fait n'est pas inexplicable; la fixation de la séreuse est immédiate dans le fixateur, le liquide fixateur pénètre tout de suite et mordance d'une façon intense les éléments superficiels, les colorations sont beaucoup meilleures à ce niveau. Les cytologistes le savent très bien et, pour des études particulièrement délicates, n'utilisent que les premières coupes, les plus superficielles. Dans la séreuse, le processus claveleux est très pur, et on peut obtenir des coupes d'une finesse et d'une transparence parfaites, ce qui n'est pas le cas, dans les conditions ordinaires de la fixation des pustules, où des granulations, des épaisseurs cellulaires gênent toujours plus ou moins l'examen.

Pustule hépatique.

On trouve dans le foie, des pustules claveleuses, généralement peu développées, caractérisées par le développement des canalicules biliaires et la prolifération de l'épithélium, suivant un processus assez semblable au processus pulmonaire; à cette prolifération est liée une infiltration interstitielle de leucocytes poly et mononucléaires: ici encore les cellules claveleuses sont présentes : je n'ai pas trouvé d'inclusions dans les épithéliums proliférés.

Pustule du rein.

La réaction épithéliale dans le rein est généralement beaucoup moins marquée; à la mort de l'animal, les pustules hépatiques ou rénales sont très petites, probablement parce que les métastases sont récentes. Il serait sans doute possible, par d'autres méthodes d'inoculation, d'obtenir des pustules d'inoculation qui seraient

intéressantes à étudier au point de vue des réactions épithéliales des divers organes.

*
* *

En résumé, l'étude histologique des lésions claveleuses nous a permis d'établir les points suivants :

1° Il existe dans la clavelée un élément caractéristique et spécifique : la cellule claveleuse à noyau vacuolisé, avec inclusion pseudo-parasitaire ;

2° Dans toutes les localisations du virus claveleux, le processus semble commencer par une lésion mésodermique accompagnée bientôt d'une réaction épithéliale proliférative, aboutissant après un certain temps à la vacuolisation cellulaire ;

3° Le processus est du même type dans la peau, le poumon, le foie, le rein ; il y a production de tumeurs épithéliales développées aux dépens des éléments préexistants de l'organe ;

4° Dans les lésions claveleuses des séreuses, peuvent être mises en évidence des granulations très fines, éparses dans le tissu œdématié ;

5° Les inclusions pseudo-parasitaires, dans les cellules mésodermiques ou ectodermiques, sont très probablement dues à la pénétration de polynucléaires qui subissent dans ces cellules des processus de dégénération.

Dans la vaccine, nous allons retrouver des inclusions différentes comme morphologie, mais ayant la même origine leucocytaire.

ÉPITHÉLIOSE VACCINALE

Dans la clavelée, le virus peut être entraîné dans les organes profonds et donner des pustules parenchymateuses.

Dans la vaccine et la variole que nous allons étudier au point de vue anatomo-pathologique, les lésions pustuleuses siègent exclusivement dans les régions à épithélium ectodermique. Le virus est localisé au niveau des pustules et le ganglion vaccinal hypertrophié est même dépourvu de virulence.

La lésion vaccinale est caractérisée par la formation d'une pustule ectodermique, due à la prolifération des cellules épithéliales *rapidement* suivie de dégénération vacuolaire ; la période proliférative est beaucoup plus courte que dans la clavelée, la

destruction cellulaire plus précoce : on ne saurait ici parler de tumeur, bien que la réaction vis-à-vis du virus soit essentiellement du même type que dans la clavelée.

Dans les pustules de la vaccine, pour la première fois, en 1892 Guarnieri a décrit le *Cytoricles vaccinæ*, et on a depuis longtemps voulu rapprocher le parasite de la vaccine du parasite du cancer.

Le champ de bataille des parasitaires et des antiparasitaires a surtout été la cornée du lapin.

Il suffit de faire sur un lapin une légère incision à la surface de la cornée, avec une lancette souillée de vaccine, pour voir au bout de peu de temps (24 à 48 heures) se développer une tache laiteuse qui se transforme en quelques jours en une véritable pustule.

Dès le premier jour, sur les coupes, on constate, dans l'intérieur des cellules épithéliales de la cornée, des corps très particuliers, réfringents, prenant fortement les matières colorantes basiques. Sous forme de boules chromatiques, ils sont souvent situés dans une vacuole périnucléaire des cellules exactement au niveau de la lésion, à droite et à gauche de la ligne d'inoculation.

A ce niveau, le protoplasma des cellules de la cornée est devenue granuleux, le protoplasma et le noyau prennent beaucoup mieux les matières colorantes, la cellule est manifestement en activité, et les cellules de la lésion vaccinale se distinguent très bien des cellules restées normales.

Les figures de karyokinèse abondent et, dans le vrai sens du mot, une petite tumeur épithéliale se développe.

Déjà, dès les premières heures, le tissu sous-épithélial montre de nombreux leucocytes, et ceux-ci, attirés au niveau de la lésion, pénètrent entre les cellules épithéliales.

Les préparations sont d'une remarquable simplicité, le tissu épithélial cornéen est très facile à étudier, il semble que l'accord devrait être fait depuis longtemps sur la vraie nature des inclusions que l'on observe. Il n'en est rien pourtant, et trois opinions sont en présence :

Pour les uns, les corps intra-épithéliaux de Guarnieri sont des parasites protozoaires; pour les autres, ils représentent des leucocytes ayant pénétré dans la cellule épithéliale; pour

d'autres, enfin, les figures en question résultent de modifications spéciales du protoplasma de la cellule [1].

L'accord, semble-t-il, sera difficile à établir, tant qu'on restera sur le terrain morphologique, et je désire simplement donner quelques figures dont l'étude m'a conduit à confirmer l'interprétation donnée par Metchnikoff, Salmon, etc. Il s'agit de leucocytes polynucléaires intra épithéliaux.

La planche IV, figures 1, 2, 3, 4, montre les formes variées de ces inclusions pseudo-parasitaires, et, malgré l'infinie variété de ces figures, il est difficile d'y voir des stades correspondant à l'évolution d'un parasite.

Le type le plus fréquent est représenté par un point chromatique homogène, logé dans une encoche du noyau et dans une vacuole qui englobe le noyau et l'inclusion, figure 4, *a*,*a*. Il y en a de toutes dimensions, depuis 1 μ jusqu'à 5 et 6 μ. Généralement, les formes petites sont à la périphérie de la lésion, les formes plus grosses sont au centre, au voisinage de la strie d'inoculation; il peut y avoir, dans une même cellule, plusieurs inclusions de dimensions inégales : il n'est pas rare de trouver des formes en bissac dans une même vacuole, il y a des formes bourgeonnantes et des formes qui simulent une division égale. Les inclusions de ce type sont colorées d'une façon intense et homogène; rarement on voit un petit liséré incolore à la périphérie.

Ces inclusions, dans l'hypothèse parasitaire, sont difficiles à interpréter : les protozoaires de cette taille sont généralement plus difficiles à colorer : les bactéries seules ou les levures ont une pareille affinité pour les couleurs basiques.

Pour caractériser un protozoaire, il faut un noyau; où est-il ici? Faut-il admettre que le protoplasma a la même affinité que le noyau pour la couleur, ou bien sont-ce des parasites réduits à leur noyau; faut-il admettre des formes de résistance, enkystées? tout cela est bien difficile.

Dans d'autres cas, le pseudo-parasite prend un aspect plasmodique, et se colore mal (fig. 4, *b*.); dans les cellules infec-

1. San Felice et Malato, dans des travaux récents, disent obtenir par l'inoculation de culture d'un staphylocoque isolé chez un varioleux des figures identiques. (Studien über Pockeln. *Archiv. für Dermatologie und Syphilis*, LXII Band. 1902).

tées, à côté du noyau et toujours dans une vacuole périnucléaire, on aperçoit des corps granuleux colorés en brun jaune et contenant une série de granulations chromatiques irrégulières, colorées en rouge par le magenta : ces grains chromatiques représentent-ils des noyaux du parasite? Mais ils sont de taille variée : il y en a de gros, il y en a de très fins. Pour un seul parasite, il y a trop de noyaux, ou bien, si ces noyaux correspondent à des stades de division nucléaire, cette division est par trop irrégulière : les parasites connus montrent des divisions nucléaires beaucoup plus égales.

On peut voir enfin, figure 1 et 4, planche IV, *c*, *c*, des formes de bourgeonnement; le plasmode parait émettre des prolongements dans différentes directions, quelquefois l'inclusion tout entière a un aspect étoilé, en rosace, actinomorphe. Les figures *c*, *c*, figure 4, sont remarquables ; à côté du noyau de la cellule épithéliale, on voit des touffes de filaments ressemblant à des filaments actinomycotiques.

Toutes les formes d'inclusion que nous venons de passer en revue peuvent être trouvées dans la même préparation, dans des cellules épithéliales diverses, à différents niveaux; elles doivent être expliquées par le même processus, et elles ont sûrement la même origine.

Dans l'hypothèse parasitaire, elles sont inexplicables; du moins, on ne connait pas de parasites qui se présenteraient d'abord sous la forme micrococcique, noyau sans protoplasma ou protoplasma sans noyau, avec divisions par bourgeonnement ou scissiparité, puis donneraient des formes plasmodiques avec noyaux multiples irréguliers, et, finalement, se transformeraient en touffes d'apparence actinomycotique.

Quel est le lien qui réunit ces formes? Quels sont les stades qui correspondent aux stades connus d'un type de Sporozoaire? On ne saisit là aucune apparence de régularité ou de vie.

Les partisans du parasitisme peuvent toujours répondre qu'il s'agit de parasites nouveaux, d'êtres non encore décrits. Il est bien certain, dans tous les cas, qu'il ne saurait être question de coccidies; nous attendrons de nouvelles preuves pour admettre la théorie parasitaire.

L'hypothèse leucocytaire est à mon avis beaucoup plus satisfaisante, plus admissible au point de vue morphologique, elle

est corroborée par toutes les réactions colorantes que présentent les pseudo-parasites, comme l'a démontré Salmon dans le laboratoire de Metchnikoff.

L'émiettement, le bourgeonnement des leucocytes, la production de boules chromatiques de dimensions variées sont choses fréquentes et familières à tous ceux qui ont étudié les phénomènes de chromatolyse à l'intérieur des cellules.

Dès les premières heures, on peut constater la présence des leucocytes dans le tissu épithélial de la cornée inoculée; ceux-ci circulent entre les cellules et peuvent certainement pénétrer dans la cellule épithéliale, attirés par quelque lésion cellulaire ou par la présence, à l'intérieur de cette cellule, de quelque chose que nous ne savons pas voir.

Les figures 2, 3, planche IV, montrent à un fort grossissement une coupe de cornée du lapin au 6e jour de l'inoculation, et le dessin exact permet de saisir le mécanisme probable de la formation des pseudo-parasites.

Tantôt le leucocyte entier pénètre dans une cellule épithéliale et constitue une grosse inclusion qui va évoluer, ou plutôt dégénérer. Tantôt, une partie du leucocyte seulement pénètre dans la cellule. Il n'est pas impossible de comprendre qu'un leucocyte circulant entre les cellules épithéliales, *a, a,* figure 3, planche IV, envoie d'abord un unique prolongement plus ou moins gros dans l'intérieur de la cellule, puis abandonne, par un brusque mouvement de recul, partie de son prolongement contenant ou non un lobe nucléaire, ou même réduit à ce lobe nucléaire. Ainsi pourrait-on peut-être expliquer la grande différence qui existe comme dimensions entre les diverses inclusions.

Les inclusions à type actinomycotique s'expliquent aussi très bien dans l'hypothèse leucocytaire, et je renvoie le lecteur aux planches du mémoire de M. Cantacuzène sur la résorption du tissu hépatique [1], qui montrent très bien, dans l'intérieur de gros macrophages, des polynucléaires phagocytés avec la forme radiée si caractéristique (ici, il ne saurait être question de protozoaires).

Ces formes radiées, étoilées du pseudo-parasite vaccinal ont été très bien vues et dessinées par Hückel [2], qui les a interprétées comme modifications du protoplasma des cellules de la cornée :

1. Ces *Annales*. T. XVI, juillet 1902.
2. Hückel, *Ziegler's Beiträge*, 1898.

nous ne partageons pas cette manière de voir. Aucune des figures d'inclusion vues dans la cornée du lapin ne m'a paru pouvoir être rapprochée des formations archoplasmiques du cancer [1].

Pustule vaccinale cutanée chez le singe.

Le virus vaccinal peut être inoculé avec succès à presque tous les mammifères; le cheval est particulièrement sensible et, sous le nom de *horse-pox*, on désigne une affection des équidés due au virus vaccinal, capable de généralisation et de localisations variées sur les diverses régions de la peau ou des muqueuses.

Chez les autres animaux, vache, lapin, mouton, singe, etc., l'inoculation vaccinale donne naissance à une pustule unique sans symptômes généraux appréciables.

Le virus est exactement limité aux lésions pustuleuses et paraît se développer surtout dans les couches les plus superficielles, soit dans le tissu épithélial, soit dans les portions sous-jacentes des régions papillaires.

La démonstration peut en être faite chez le lapin.

On rase la peau du dos d'un lapin suivant le procédé indiqué par Calmette, ou bien on épile la peau dorsale d'un lapin, choisi à peau fine, et on dépose le virus vaccinal sur cette peau rasée ou épilée; on constate après 48 heures, dans le courant du 3e jour, l'apparition de petites taches rouges qui évoluent rapidement et donnent des pustules vaccinales caractéristiques; suivant la quantité de virus utilisé, l'éruption peut-être discrète ou confluente. — Lorsque l'éruption est parfaitement établie, vers le 5e ou le 6e jour, le raclage superficiel des pustules est très virulent, tandis qu'il est absolument impossible de recueillir la moindre trace de virus par ponction sous-cutanée ou même en raclant la peau du lapin par la face profonde; le virus est exactement localisé dans les portions cutanées les plus superficielles.

L'examen histologique confirme ces résultats, les lésions

1. M. Sikovsky, dans les *Archives Russes des Sciences biologiques*, vient de publier un travail dans lequel il montre qu'on peut obtenir des figures tout à fait identiques aux corpuscules de Guarnieri, en inoculant sur la cornée par scarification du vaccin chauffé, ou du sérum de lapin, ou de la toxine diphtérique. *Arch. Russes.* Fasc. 5, Tome IX.

vaccinales chez le lapin sont tout à fait superficielles, intéressant presque exclusivement le tissu épithélial et la zone papillaire sous-épithéliale; il y a prolifération de la zone malpighienne, suivie rapidement de fonte cellulaire.

Le singe donne de beaucoup les plus belles pustules. Dès le 3e jour, la pustule commence à se développer, elle est vésiculeuse dès le 6e jour; les coupes du 4e au 5e jour sont surtout intéressantes.

La figure 1, planche II. montre une pustule de la région dorsale chez le singe au 4e jour. — Déjà le processus de vésiculisation cellulaire est très avancé; comme dans la clavelée, il suit une période de prolifération.

La lésion de la cellule épithéliale débute toujours par la formation d'une vacuole autour du noyau dans les cellules de la couche moyenne de Malpighi; dans la vacuole, pénètrent des leucocytes qui ici sont de toute évidence. Le dessin montre dans la cellule, autour du noyau, l'apparition d'une substance granuleuse colorée en rose pâle, *a*, *a*.

La couche basale de l'épithélium est atteinte plus tardivement, mais subit le même sort; la vésicule vaccinale se trouve constituée par la fonte des éléments épithéliaux ; d'autre part, la lésion vacuolaire des cellules atteint progressivement les couches superficielles.

Autour de la vésicule centrale, les cellules épithéliales contiennent des inclusions de plusieurs sortes.

Dans les couches superficielles, le protoplasma subit des modifications qui se traduisent par l'apparition de réseaux chromatiques, imbriqués, en couches concentriques ou formant une sorte de casque qui coiffe le noyau; en même temps, des gouttes éléidiniques remplissent certaines cellules et sur des frottis pourraient donner l'illusion de nombreux parasites. (Pl. II, *fig.* 1, *b*, *b*.) Dans les cellules de la couche moyenne, les inclusions pseudo-parasitaires sont dues à la pénétration de leucocytes, ou de fragments de leucocytes, suivant le processus que nous avons indiqué au sujet de la pustule cornéenne chez le lapin. — En résumé, dans le cas de la vaccine, la lésion est presque exclusivement épithéliale, le tissu sous-épidermique paraît à peine intéressé et seulement au contact immédiat des papilles et de l'épithélium.

ÉPITHÉLIOSE VARIOLIQUE

Le virus de la variole doit être très voisin du virus vaccinal, et la discussion est toujours ouverte pour savoir si les deux virus sont des adaptations d'un virus unique, ou s'ils constituent deux virus différents.

Peut-on faire de la vaccine avec de la variole? Le fait de vaccination réciproque plaide en faveur de la communauté d'origine.

L'homme et le singe sont surtout sensibles. Chez le lapin, l'inoculation de virus varioleux sur la surface cutanée reste sans résultat; l'inoculation dans l'œil donne une pustule, visible seulement au microscope, et qui peut être considérée comme une pustule vaccinale en miniature; les mêmes inclusions existent dans les cellules, mais en très petit nombre; cette minime lésion de l'œil par le virus varioleux n'est pas suffisante pour conférer l'immunité au lapin; inoculé par la méthode Calmette sur la peau du dos, le lapin montre une belle éruption vaccinale.

Je puis ici citer, en passant, l'expérience que nous avons répétée plusieurs fois avec MM. Roux et Nocard, et qui nous a montré que l'inoculation sous-cutanée ou intra-veineuse de virus varioleux ne conférait pas l'immunité vaccinale à la génisse.

Il semble que l'immunité est fonction de la pustule : le singe, également sensible aux deux virus, peut être facilement vacciné par une pustule vaccinale contre la variole ou *vice versa.*

L'homme constitue de beaucoup l'espèce la plus sensible au virus varioleux.

Je ne veux pas ici faire une description de la variole, il me suffira de noter que les lésions varioliques, chez l'homme, sont presque exclusivement épidermiques (surface cutanée, muqueuse de la bouche ou de l'œsophage). Même dans le cas de généralisation sur toute la surface cutanée, il ne semble pas démontré que les organes profonds soient atteints.

Chez l'homme, l'étude de la pustule variolique est facile; la figure 2, planche II, représente la coupe d'une pustule de généralisation prélevée par biopsie avant toute apparence de vésiculation et sans infection secondaire.

La coupe fixée et colorée, suivant la technique jusqu'ici employée, montre, au niveau des papilles situées au centre de la pustule, une infiltration inflammatoire très évidente; dans le cas de généralisation, il faut bien admettre que le virus arrive par les vaisseaux au niveau de la surface cutanée; il doit s'arrêter à l'extrémité papillaire et provoquer là une lésion avec extravasation de sérosité, diapédèse de leucocytes, etc. Cette lésion est bientôt suivie d'une réaction épithéliale avec prolifération des cellules et vésiculisation rapide; les coupes en série montrent que la pustule a toujours pour centre une lésion papillaire; j'ai cherché en vain à ce niveau un parasite visible.

La grosse lésion de la variole consiste dans la formation énormes vacuoles au centre du réseau de Malpighi, comme cela est figuré dans le dessin. Ces vacuoles se réunissent de proche en proche par dégénération de nouvelles cellules; une infiltration leucocytaire considérable survient bientôt.

Au pourtour de la vacuole centrale, on peut étudier les débuts de la fonte cellulaire; avec une intensité plus grande, le processus est le même que dans la clavelée ou la vaccine; les cellules deviennent hydropiques, les filaments protoplasmiques disparaissent, le noyau devient vésiculeux et augmente de volume, il se forme de véritables plasmodes de cellules épithéliales par fusion de cellules voisines. Voir la planche II, figure 2, *g*.

Dans les couches superficielles, nous retrouvons la production de granules éléidiniques en quantités considérables : toutes les cellules sont remplies de boules chromatiques dont les dimensions sont très variables, depuis 1 μ jusqu'à 5 à 6 μ. Ce processus éléidinique est très intense, et ces granulations intracellulaires sont fortement colorées par toutes les couleurs basiques d'aniline; on les a souvent décrites comme parasites, surtout lorsqu'on les a trouvées dans des frottis (Roger). Il est de toute évidence qu'il ne s'agit pas de parasites. D'ailleurs, les pustules de la variole ne peuvent d'aucune façon prêter matière à confusion, au point de vue des sporozaires; si, dans la pustule vaccinale de la cornée, il est difficile de reconnaître les leucocytes intra-épithéliaux pseudo-parasitaires, dans la pustule cutanée variolique, les leucocytes intra-épithéliaux sont facilement reconnaissables comme tels.

Avec la variole, nous nous éloignons déjà beaucoup des formes un peu bizarres de dégénération leucocytaire qui ont donné naissance à la théorie coccidienne, dans la pustule cornéenne vaccinale ou même dans les pustules cutanées claveleuses.

Avec la fièvre aphteuse, nous n'aurons plus à discuter de la nature parasitaire ou leucocytaire des inclusions intra-épithéliales; les leucocytes qui circulent dans le tissu épithélial ou pénètrent dans les cellules sont parfaitement reconnaissables; il ne peut plus être question de coccidies et, pourtant, comme nous allons le voir, la lésion de la fièvre aphteuse est superposable à la lésion variolique.

ÉPITHÉLIOSE APHTEUSE

Je ne veux pas ici entrer dans la description de la maladie, et me contente de retenir les lésions de la peau ou des muqueuses qui permettent de relier cette affection pustuleuse à la vaccine, à la variole, à la clavelée.

L'examen microscopique des aphtes confirme en tous points cette manière de voir; la pustule aphteuse peut être superposée à la pustule variolique ou vaccinale.

Ici encore, les lésions cellulaires, après une période de prolifération rapide, débutent dans la couche moyenne du réseau de Malpighi, comme le montre la planche III, figure 1, pustule aphteuse développée sur le groin d'un cochon; les cellules deviennent vacuolaires, le réseau fibrillaire protoplasmique disparaît par une véritable fonte, le noyau est isolé dans une vacuole, et les cellules détachées nagent isolées dans le liquide des pustules jusqu'à liquéfaction totale.

Les couches basales de l'épithélium disparaissent quelquefois et le derme est à nu, infiltré de leucocytes en quantité considérable; les couches superficielles de l'épithélium résistent beaucoup plus longtemps, et la lésion aphteuse, vésiculaire, peut s'étaler en large surface, de proche en proche, par liquéfaction des cellules de la couche moyenne. Ici, pas de pseudo-parasites, mais une infiltration leucocytaire considérable inter et intracellulaire.

ÉPITHÉLIOSE BOVI-PESTIQUE

M. Nicolle, à Constantinople, a pu étudier la peste bovine, et a démontré que le virus pestique, dans certaines conditions, passait à travers les filtres; cette maladie très grave, à forme septicémique, est caractérisée par des lésions pustuleuses de la muqueuse intestinale, de la muqueuse buccale et par des éruptions cutanées (dans les formes peu graves) sur les mamelles, le scrotum, le périnée, le pourtour de la vulve, la face interne des membres.

M. Nicolle a bien voulu me confier des pièces fixées par M. Adil-Bey avec le fixateur dont j'ai déjà donné la formule, et j'ai pu étudier, dans les meilleures conditions, les lésions de la muqueuse intestinale et de la muqueuse buccale.

Je donnerai ici seulement la description de la pustule buccale.

La figure 2, planche III, représente la coupe d'une pustule, elle montre d'une façon évidente l'action intense du virus pestique sur le tissu épithélial.

A la limite de la pustule, dans les couches basales, les figures de karyokinèse sont en grand nombre. La lésion débute toujours par la couche moyenne et s'étend rapidement aux couches les plus superficielles de l'épiderme, de telle sorte que la pustule est rapidement ulcérée; des leucocytes, en grand nombre, infiltrent le tissu épithélial ; ils sont logés dans la trame vacuolaire des anciennes cellules; ici encore, les cellules épithéliales montrent les formations éléidiniques que nous avons signalées dans la variole ou la clavelée, (*e*, *é*, *è*), il y a formation de véritables cellules géantes épithéliales comme dans la variole; les leucocytes pénètrent dans les cellules dont le noyau devient hydropique; les couches basales de l'épithélium résistent plus longtemps; elles se regénèrent par un *processus* de multiplication intensive; 6 figures de karyokinèse sont visibles en un seul point de la coupe dessinée. figure 2, planche III.

La lésion est essentiellement du type des maladies pustuleuses et, malgré la forme septicémique et la présence du virus dans le sang, nous nous croyons autorisé à faire rentrer la peste bovine dans le groupe des épithélioses que nous étudions dans ce travail.

ÉPITHÉLIOSE ACNÉIQUE

Acné varioliforme ou molluscum contagiosum.

Marx et Sticher [1] viennent de démontrer que le virus de l'*Epithélioma contagieux des oiseaux* passe à travers les filtres.

Cette affection, pour laquelle le mot *Epithéliose* me paraît préférable, est une maladie du pigeon et de la poule, caractérisée par la présence de tumeurs épithéliales sur la crête, les paupières, le bec, etc. Elle est facilement inoculable; quelques jours après l'inoculation, les tumeurs se développent, et les cellules épithéliales néoformées présentent des modifications protoplasmiques tout à fait spéciales; la cellule devient énorme, hydropique, le noyau est repoussé par le développement de masses granuleuses, mamelonnées, dont la vraie nature reste encore obscure.

Macroscopiquement, la tumeur est verruqueuse, les auto-inoculations déterminent la production de tumeurs souvent très grosses.

La lésion décrite chez l'homme sous le nom de *molluscum contagiosum* est une Épithéliose très voisine de celle des oiseaux.

Au point de vue histologique, la tumeur du molluscum est constituée par un développement exagéré des cellules de l'épithélium malpighien; il se constitue un bourgeon épithélial, mamelonné, invaginé, quelquefois gros comme un pois, qui proémine à la surface cutanée; au centre de cette sorte de verrue, existe une dépression par où s'exfolient des cellules épithéliales kératinisées. La tumeur est nettement délimitée du côté du derme et peut être facilement énucléée.

Les couches basales sont normales, mais peu à peu les cellules de la 3e ou 4e assise deviennent granuleuses, hydropiques; à côté du noyau, il se forme dans le protoplasma des granulations confluentes qui repoussent le noyau, et constituent des masses bourgeonnantes, remplissant quelquefois toute la cellule. Les cellules s'individualisent, elles s'entourent d'une membrane épaisse, puis se transforment en des blocs kératinisés qui sont exfoliés. Les cellules enkystées du molluscum ont

1. Marx et Sticher, *Untersuchungen über das Epithelioma contagiosum des Geflügels. Deut. med. Woch.*, 11 déc. 1902.

été les premières coccidies, et le point de départ de toute la question des Sporozoaires (Neisser, 1889).

Dans le molluscum des oiseaux, l'action du virus inoculable, mais encore indéterminé, filtrable, par conséquent petit, se traduit par une prolifération du tissu épithélial constituant une véritable tumeur.

Suivant notre définition, le molluscum doit rentrer dans le groupe des Epithélioses, et les cliniciens avaient depuis longtemps remarqué cette parenté, puisque la maladie est désignée souvent sous le nom d'*acné varioliforme*.



Nous avons passé en revue différents types de maladies, caractérisées par la multiplication des cellules épithéliales sous l'influence de virus divers, et nous proposons de les réunir par ce caractère commun sous le nom générique d'*Epithélioses*.

Varicelle, verrues, papillomes, affections épithéliales encore mal connues trouveront peut être plus tard, place dans ce groupe.

Un autre caractère non moins important justifie ce groupement et paraît être déjà suffisamment mis en évidence. Les agents infectieux, les virus de ces Epithélioses ont un point commun : ils sont assez petits pour passer à travers les filtres qui retiennent les microbes ordinaires.

La démonstration est déjà faite pour la fièvre aphteuse (Lœffler), pour la clavelée (Borrel), pour la peste bovine (Nicolle et Adil-Bey), pour le *molluscum contagiosum* (Marx et Sticker) et ce fait expérimental doit l'emporter, semble-t-il, sur les discussions morphologiques.

L'exemple de la péripneumonie qui passe à travers les filtres et qui cultive sous forme d'éléments à peine visibles doit orienter les recherches plutôt du côté des microbes petits ; il doit forcer les partisans de la théorie coccidienne à admettre des formes de leurs parasites assez petites pour traverser les filtres, et ces formes petites dont l'existence est la plus certaine sont évidemment celles qu'ils n'ont pas vues.



Quel est le lien que l'on peut établir actuellement entre ces

différentes maladies à réactions épithéliales et les maladies cancéreuses, entre les Epithélioses et l'Epithélioma ?

Par les Sporozoaires, les partisans de la théorie parasitaire du cancer ont voulu réunir les maladies éruptives et les tumeurs cancéreuses. Nous avons vu que cette assimilation pêchait par la base : il faudrait d'abord démontrer l'existence de ce sporozoaires.

Pour nous, l'étude des épithélioses et de la clavelée en particulier doit jusqu'à un certain point servir d'introduction à l'étude des tumeurs cancéreuses ; la culture du virus claveleux, par exemple, constituerait un progrès important, parce qu'elle nous permettrait de connaître l'un de ces *petits* virus dont l'action détermine la multiplication des cellules épithéliales : le virus cancéreux, lui aussi, fait proliférer les épithéliums, et l'étude de la clavelée ou des Epithélioses en général facilement inoculables sera toujours beaucoup plus simple que l'étude du virus cancéreux, dont l'inoculabilité est encore entourée de mystères.

ÉPITHÉLIOMA DE LA SOURIS

Morau [1], en 1894, a publié un mémoire très encourageant sur l'inoculabilité du cancer de la souris ; dans ses expériences, l'inoculation était toujours suivie de succès. Ces résultats n'avaient jusqu'ici eu aucune confirmation.

Tout récemment, Jensen [2] a publié le résultat d'expériencse faites sur la souris et dit avoir obtenu jusqu'à 8 passages de souris à souris.

J'ai moi-même, il y a près d'un an, commencé l'étude expérimentale du cancer de la souris, et j'ai pu faire 6 passages, à condition d'inoculer à chaque passage un certain nombre d'animaux (12 à 15). Dans mes expériences, l'inoculation est loin de réussir à tout coup, et la proportion des inoculations réussies ne dépasse pas 1 sur 10. Cette proportion est beaucoup plus élevée dans les expériences de Jensen : 2 sur 5 en moyenne ; elle était énorme dans le cas de Morau : 4 sur 5.

Dans les expériences de Morau, c'est seulement après 3 ou

1. MORAU, Sur la transmissibilité de certains néoplasmes, *Arch. de Med. Exp.* 1894.

2. C. O. JENSEN, Nogle torsog med. Kœrtsvulster. *Hospitalsdende*, n° 19, 7 mai 1902.

4 mois d'incubation que les souris inoculées montrent un début de développement de tumeurs.

Chez Jensen, comme chez moi, lorsque l'inoculation est positive, du 12e au 20e jour, on perçoit sous la peau un nodule qui grossit rapidement, et déjà, au bout de 40 jours, la tumeur pèse plus que la souris elle-même.

Le cancer de la souris peut être inoculé à certaines souris, mais toutes les souris ne sont pas inoculables; pour avancer sûrement dans cette question, il faudra d'abord établir le déterminisme exact de l'inoculation positive.

Les cas de cancer spontané de la souris ne sont pas rares; ils peuvent être très fréquents dans un même élevage, dans une même cage.

Il y a deux mois environ, j'ai eu connaissance d'un élevage de souris où les cas de cancer spontané étaient relativement fréquents; dans l'espace de 1 mois, trois souris cancéreuses, de la même origine, furent apportées au laboratoire.

J'allai moi-même visiter cet élevage de souris, et la dame qui élevait les bestioles me déclara que, depuis deux ans, elle avait eu dans la même cage plus de 20 cas de « grosseurs » chez ses souris; en tout 200 souris environ étaient nées chez elle, et beaucoup d'ailleurs avaient été vendues encore jeunes; les cas observés portaient seulement sur les souris conservées pour la reproduction. La proportion est donc énorme de souris cancéreuses, devenues cancéreuses dans la même cage. Des observations ultérieures seront faites sur cette lignée si éminemment cancéreuse pour déterminer la part respective de l'hérédité ou de la contagion dans le développement de ce cancer de la souris.

Il y a deux ans, M. Giard avait eu dans son élevage de souris une proportion assez notable de cas de cancer et, grâce à son amabilité, j'avais pu faire l'étude histologique de quelques-uns de ces cas.

Tout récemment, j'ai eu à ma disposition un nouveau lot de souris, provenant d'une seule et même cage; deux souris sont cancéreuses et, dans cette cage, depuis un an, cinq ou six souris cancéreuses ont passé; dans tous ces cas, il semble bien qu'une cause de contagion locale doit être invoquée.

En effet, dans d'autres élevages, beaucoup plus importants, que je connais et qui fournissent des centaines et des centaines

de souris par an, jamais un cas de cancer n'a été observé. Tous ces faits plaident en faveur de l'existence du virus cancéreux.

Chez la souris il s'agit d'un vrai épithélioma qui débute dans les culs-de sac glandulaires et souvent au niveau des mamelons, à l'aine, à l'aisselle ou au niveau de l'abdomen; la métastase ganglionnaire est rapide et évolue en même temps que la tumeur principale ; quelquefois, la vulve est le point de départ.

J'ai laissé évoluer les tumeurs spontanées ou inoculées jusqu'à cachexie complète, la tumeur devient quelquefois énorme, plus grosse que la souris elle-même; la mort arrive en un ou deux mois; souvent, la tumeur s'ulcère et, à l'autopsie, on trouve toujours des métastases dans le poumon.

Le type de la tumeur est toujours le même : elle a presque toujours une structure tubulée très nette, elle est constituée par des tubes ou des cylindres épithéliaux, formés tantôt d'une couche cellulaire gardant le type acinus, ou bien de plusieurs assises cellulaires formant des cylindres pleins et de véritables bourgeons épithéliaux (*Fig.* 3, pl. VI).

La tumeur s'accroît périphériquement, elle s'énuclée généralement bien, adhérente seulement par un côté à la face profonde de la peau. Les réactions conjonctives autour des cylindres épithéliaux sont très peu marquées, et la tumeur est presque exclusivement constituée par des éléments épithéliaux, dans des mailles conjonctives très lâches.

Les tumeurs métastatiques gardent exactement, soit dans les ganglions, soit dans le poumon, la structure de la tumeur principale.

Le mode de généralisation au poumon par métastase cellulaire et par la circulation générale était dans un cas de toute évidence.

J'ai dessiné, planche VI, figure 2, une portion de la coupe du poumon à un faible grossissement.

La métastase pulmonaire est exlusivement intra-vasculaire, intra-veineuse ; sur la figure on voit la coupe d'un bourgeon épithélial, absolument isolé dans le vaisseau, toutes les grosses veines satellites des bronches sont, sur la coupe, remplies du tissu cancéreux et, dans ce cas, la métastase ne constitue pas à proprement parler une tumeur pulmonaire, mais une embolie

cancéreuse dans les vaisseaux du poumon : il y a eu transport et greffe de quelques cellules de la tumeur initiale entraînées par le courant circulatoire dans les vaisseaux du poumon, qui a fonctionné comme filtre d'arrêt.

Dans le cas particulier, ce mode de généralisation a le caractère d'un véritable schéma.

En étudiant à un fort grossissement les cellules cancéreuses de la souris dans le cas d'une métastase pulmonaire, j'ai constaté que certains tubes épithéliaux et non tous présentaient des inclusions intra-cellulaires sur la nature desquelles je manque de données positives.

Le dessin, figure 3-4, planche VI, mieux que toute explication, permet de se rendre compte de la morphologie de ces inclusions ; il s'agit tantôt de corps très chromatiques, petits, irréguliers comme forme, tantôt de masses relativement grosses, 5 à 6 μ, mal colorées, aréolaires, situées à côté du noyau dans la portion du protoplasma voisine de la lumière du tube. Fait à retenir : tous les tubes ne montrent pas ces inclusions, et lorsqu'un tube les présente, elles ont toutes, dans ce même tube, la même structure : toutes petites et très chromatiques. ou bien toutes plus grosses, peu colorées et alvéolaires, absolument comme dans un tube séminifère, toutes les cellules sont en même temps au même stade de division.

Grossièrement ces inclusions ressemblent aux inclusions décrites dans les bronches de la pustule claveleuse, figure 1, planche VI; dans ce cas, il s'agirait de fragments de leucocytes ou de leucocytes entiers ayant pénétré dans les cellules. Cette opinion pourrait se soutenir et le fait serait intéressant au point de vue qui nous occupe : les lésions de la cellule épithéliale dans les deux cas, seraient très voisines et de même ordre.

On pourrait aussi penser à quelque modification du protoplasma de la cellule, en rapport avec des phénomènes de sécrétion. — Les éléments manquent pour se faire une opinion définitive et absolue, et ces inclusions demandent à être mieux étudiées.

Si nous comparons maintenant le processus pulmonaire dans l'Épithéliose claveleuse, au processus pulmonaire dans l'Épithélioma de la souris, nous pouvons établir une différence radicale entre les deux maladies, bien que, macroscopiquement, la res-

semblance soit grande. — Dans la clavelée, ce sont les cellules préexistantes des organes et du poumon en particulier qui prolifèrent et donnent la néoformation épithéliale sous l'influence du virus; dans le cancer, au contraire, ce sont les cellules cancéreuses de la tumeur initiale, métastatiques elles-mêmes, qui vont se fixer dans le poumon et constituer par leur développement un nouveau tissu dans le tissu pulmonaire.

En d'autres termes, dans la clavelée que nous prendrons comme type d'Épithéliose, le virus touche et peut faire proliférer différents Épithéliums : il y a une pustule cutanée, une pustule pulmonaire, une pustule hépatique, une pustule rénale, etc, avec les réactions et les caractères des cellules de chaque organe; dans le cancer, il n'y a qu'un seul type cellulaire, hétéromorphe, métastatique lui-même, et les tumeurs dans les différents organes peuvent être considérées comme les prolongements de tumeurs primitives.

Il y a une différence essentielle entre les lésions claveleuses et les lésions cancéreuses;

L'étude comparative que nous avons faite des épithélioses et de l'épithélioma nous permet seulement de les rapprocher, elle montre que la prolifération épithéliale dans les tumeurs cancéreuses ne constitue pas une réaction exceptionnelle, sans analogue dans les maladies virulentes connues, et cette constatation ne peut qu'encourager la recherche du virus cancéreux.

La démonstration n'en paraît pas facile; l'inoculabilité du cancer de la souris n'est même pas établie sur des expériences sans conteste. L'expérience cruciale manque encore.

L'objet d'étude le plus favorable semble être actuellement le cancer de la souris; et la question aura fait un grand pas le jour où, en dehors de toute intervention de la cellule cancéreuse vivante, l'inoculation positive aura définitivement fait justice des théories diathésiques du cancer [1].

1. La question du cancer de la souris est intimement liée à celle du cancer humain, et cette question du cancer est à l'ordre du jour dans beaucoup de laboratoires; des essais sérothérapiques sont faits en différents lieux et certainement méritent d'être continués. Jensen a publié le résultat d'expériences, malheureusement trop peu nombreuses, faites avec le sérum de lapins soumis à des injections répétées de tumeurs de la souris; ce sérum aurait donné de bons résultats dans le cas de tumeurs traitées au début.

On peut déjà prévoir qu'il sera possible, avec la souris, d'établir d'une façon expérimentale et certaine ce que l'on doit attendre de la sérothérapie cancéreuse.

*
* *

En résumé et comme conclusions à ce travail, nous avons voulu surtout établir que les maladies cancéreuses ne constituent pas un groupe pathologique absolument à part et sans analogue dans les maladies virulentes.

A son point de départ, la théorie coccidienne des tumeurs épithéliales avait eu une vogue considérable, parce qu'on ne connaissait à ce moment que des parasites intra-cellulaires, des

Les résultats cliniques obtenus par Richet et Héricourt d'abord, par Dungern, Charcot, Leyden et Blumenthal, ont été plus ou moins satifaisants, mais toujours très inconstants et peu nets : aucun des expérimentateurs n'a pu tirer de conclusion définitive, à cause de l'absence d'une base expérimentale.

Pourtant, les essais de traitement, même empiriques, méritent d'être continués.

On peut, en l'état actuel, viser deux éléments dans la tumeur cancéreuse : d'une part, la cellule cancéreuse que beaucoup considèrent encore comme le vrai parasite se développant comme élément étranger à l'organisme : dans cette hypothèse, l'étude des cytotoxines a suggéré déjà l'idée de faire un sérum anticellulaire et on a inoculé des cancers à des animaux pour obtenir un sérum anti.

Personne que je sache n'a jusqu'ici essayé de prendre la tumeur opérée chez une malade déterminée, d'obtenir un sérum anti chez un animal, et de réinoculer à la même malade, le plus tôt possible après l'ablation de la tumeur, l'anti-corps cellulaire supposé actif.

D'autre part, il faut tenir compte d'un autre facteur qui n'est pas négligeable, la présence possible, dans la tumeur cancéreuse, de parasites et d'un virus qui peut en l'état actuel être considéré comme plus ou moins voisin des virus de nos Épithélioses ; or, rien de plus facile que d'obtenir un sérum actif contre la vaccine, la peste bovine, la fièvre aphteuse et la clavelée par l'inoculation des tissus virulents. On peut essayer de faire de même pour le cancer, et il est important dans ce cas de ne prendre que des tumeurs du même type.

La technique à employer et qui tient compte des deux facteurs : cellule et virus, me paraît être la suivante, et j'ai déjà entrepris des recherches dans cette voie.

Le cas le plus simple est celui des tumeurs cancéreuses du sein. Après l'ablation chirurgale du sein, le tissu cancéreux est broyé et inoculé en masse à un mouton. Avec la technique employée, j'ai pu inoculer sans inconvénient en une seule fois jusqu'à 100 grammes de tissu cancéreux mis en suspension dans 500 c. c. d'eau physiologique. La résorption est rapide, en 5 ou 6 jours. Huit jours après, le mouton est saigné à 500 c. c., 15 jours après, saigné de nouveau ; ainsi, on récolte une quantité de sérum *tout à fait spécifique*, en quantité suffisante pour faire à la malade, tous les mois ou toutes les trois semaines, une inoculation de 20 c. c. de sérum, *supposé actif*. Le même mouton, dans le cas d'une 2e malade et d'une nouvelle ablation de tumeur cancéreuse, est de nouveau inoculé en suivant la même technique, et saigné 8 jours et 15 jours après cette 2e inoculation ; le sérum recueilli est spécifique pour le 2e cas dans l'hypothèse cytotoxique; il est plus actif que le 1er, dans le cas de l'hypothèse parasitaire.

Plusieurs malades sont déjà en traitement par ce sérum polyvalent et spécifique, les résultats seront jugés plus tard, lorsque les cas seront assez nombreux et le temps écoulé assez long pour savoir si un pareil sérum, inoculé pendant 2 ans, tous les mois, est capable d'empêcher les métastases dans les organes et d'arrêter le processus cancéreux.

Ce temps-là n'est pas proche, et à cause de cela, j'ai cru devoir publier ici les indications qui précèdent.

protozoaires, des coccidies capables de faire proliférer les cellules épithéliales. J'ai essayé de montrer déjà, dans mon rapport au Congrès de Paris de 1900, que beaucoup de parasites étaient capables de produire le même résultat: coccidies, levures, champignons, etc.

L'étude actuelle des Épithélioses nous montre que beaucoup de virus à réaction épithéliale traversent les filtres et doivent rentrer dans le groupe des microbes petits.

Il serait téméraire d'affirmer qu'il en est de même pour le virus cancéreux; mais l'hypothèse est plausible ; elle doit orienter les recherches, non d'une façon exclusive. Elle ne doit pas, en effet, trop décourager les chercheurs qui, jusqu'à ces derniers temps, ont essayé de retrouver dans leurs coupes des stades caractéristiques d'une coccidie, mais le vent ne paraît pas souffler du côté des Sporozaires jusqu'ici décrits, et Bosc lui-même, qui avait décrit dans de multiples travaux des « *stades évidents* », reconnaît maintenant qu'il avait été trop loin, et il ne trouve plus ses figures aussi *caractéristiques;* les parasites de la vaccine sont fortement battus en brèche par le travail récent de Sikorsky, qui obtient par inoculation de toxine diphtérique sur la cornée ou par inoculation de vaccin chauffé des figures identiques.

Reconnaissons simplement que l'étiologie des tumeurs malignes reste encore obscure, et gardons-nous surtout d'établir un lien trop intime entre les Épithélioses infectieuses et les Épithéliomas.

Il y a analogie, il n'y a pas identité.

1. *Loc. cit.*

EXPLICATION DES PLANCHES

A part les figures 1, 2 et 3 de la planche V, obtenues après fixation et coloration par la méthode de Laveran, toutes les figures proviennent de frottis ou de coupes fixés par la même méthode.

Acide osmique	2
Acide chromique	3
Chlorure de platine	2
Acide acétique	20
Eau	350

La méthode de coloration a été la même dans tous les cas : rouge magenta, — picro-indigo-carmin. Seule la figure 1, planche II, a été obtenue après coloration par : rouge magenta, — bleu à l'argent-acide picrique. Les figures 6, 7, planche V, ont été obtenues après coloration thionine-tannin.

PLANCHE I

Fig. 1. — Coupe d'une pustule d'inoculation avec virus pur, 8e jour, paroi abdominale.

La surface cutanée est à droite, la coupe passe au voisinage d'un follicule laineux et montre des squames épidermiques pénétrant dans la profondeur, colorées en rouge.

En *a*, la zone des cellules vacuolisées contenant de nombreuses gouttes éléidiniques

En *b*, cellules invaginées, pseudo-kystiques, à filaments radiaires (pseudococcidies du type Darier-Wickham).

Plus profondément, les cellules des couches profondes du réseau de Malpighi ont le noyau vacuolisé et contiennent une inclusion paranucléaire, (les formes bourgeonnantes sont fréquentes, — comparer avec les figures de la vaccine, cornée du lapin, planche IV).

En *c*, cul-de-sac glandulaire, la couche basale montre les cellules à noyau vacuolisé et des inclusions du même type que *b*.

En *d*, *cellules claveleuses*, mésodermiques avec noyau vacuolisé et inclusion paranucléaire du même type que dans les cellules ectodermiques.

De nombreux leucocytes polynucléaires plus ou moins reconnaissables sont présents dans le tissu œdématié.

Fig. 2. — Coupe d'une tumeur claveleuse pulmonaire chez un animal sacrifié au 15e jour.

Portion périphérique d'un nodule sous-pleural : en *B* épithélium proliféré d'une bronchiole ; en *A*, alvéoles pulmonaires à épithélium cubique. Toutes les cellules contiennent de nombreuses granulations cellulaires. — L'épithélium des alvéoles et l'épithélium bronchique, ici, ne contiennent pas d'inclusion, le noyau n'est pas vacuolisé.

En *a*, dans le tissu conjonctif, entre les alvéoles, se trouvent de nombreuses cellules claveleuses mésodermiques, à noyau vacuolisé et grosses inclusions.

PLANCHE II

Fig. 1. — Pustule vaccinale chez le singe. Région dorsale au 4e jour.

La coupe, fixée par le mélange usuel, a été colorée par rouge de Magenta, bleu à l'argent-acide-picrique.

Les noyaux ont pris une coloration violette. — Dans les cellules épithéliales, les différentes inclusions sont restées colorées en rouge.

Au centre de la pustule, dans la zone déjà vacuolisée, les cellules subissent une véritable fonte qui débute par la formation d'une vacuole périnucléaire.

En *a*, dans la vacuole autour du noyau, se distingue, très bien colorée en rose pâle, une substance granuleuse, avec pénétration de leucocytes polynucléaires, plus ou moins reconnaissables; le processus est semblable à celui que nous trouverons dans la pustule cornéenne, il est ici plus net.

En *b*, dans les couches épithéliales superficielles, se produisent de nombreuses gouttes éleidiniques, et certaines portions du protoplasma se disposent sous forme de couches concentriques englobant le noyau, ou formant comme un casque au-dessus du noyau.

Des leucocytes plus ou moins reconnaissables, quelquefois réduits à l'aspect de boules chromatiques, sont épars dans toute la pustule.

Au-dessous du tissu malpighien, on note une très légère infiltration cellulaire.

Fig. 2. — Pustule variolique prélevée par biopsie dans un cas de variole généralisée sans infection secondaire (peau de la cuisse.)

La pustule montre le premiers débuts de la vésiculisation. Dans le tissu malpighien hypertrophié, les cellules de la couche moyenne sont déjà détruites et remplacées par de grandes vésicules à contenu amorphe, infiltrées de leucocytes polynucléaires. Le début du processus se voit en *a*, les cellules deviennent hydropiques, et les filaments protoplasmiques disparaissent.

En *g*, des ponts épithéliaux persistent encore, et des cellules géantes ou plutôt des plasmodes cellulaires d'origine épithéliale sont visibles.

Les couches basales sont encore intactes; au niveau de la papille centrale, un processus inflammatoire est très évident.

Les cellules épithéliales superficielles contiennent en nombre immense des granulations chromatiques d'origine éleidinique.

PLANCHE III

Fig. 1. — *Pustule aphteuse.*

La pustule a été prélevée avant vésiculation sur le groin d'un cochon.

La lésion importante siège dans la zone moyenne du réseau de Malpighi. Les cellules subissent un rapide processus de fonte. Autour du noyau, il y a formation d'une vacuole et quelquefois pénétration de leucocytes polynucléaires dans la cellule.

Au niveau des papilles, on peut voir un processus inflammatoire très net.

Fig. 2. — *Peste bovine.*

Érosion de la muqueuse buccale chez le bœuf.

Le processus destructif dans la peste bovine est extraordinairement intense, et touche presque en même temps les couches superficielles et les couches moyennes de l'épithélium malpighien.

En *a*, la trame cellulaire ancienne est remplacée par une série de lacunes, infiltrées de leucocytes et de débris leucocytaires.

En *g*, *g'* il y a hydropisie cellulaire, gonflement et lobulation du noyau, formation de cellules géantes épitheliales.

Dans les cellules malpighiennes, il y a, comme dans la variole, production de gouttes éleidiniques, le processus est un peu différent : il s'agit ici d'une lésion de muqueuse et non d'une lésion cutanée.

Les couches basales de l'épithélium prolifèrent abondamment.

Cinq figures de karyokinèse *k*, *k*, *k*, peuvent être notées dans la portion de la coupe qui a été dessinée.

PLANCHE IV

Fig. 1. — *Corspuscules de Guarneri dans la cornée du lapin.*

Lésion de la cornée au 5e jour, au niveau de la ligne de scarification.

En *a*, formes microscopiques du pseudo-parasite, logées dans une vacuole périnucléaire et dans une encoche du noyau ;

En *b*, formes plasmodiques granulaires avec petits corps chromatiques;

En *c*, formes radiées et bourgeonnantes;

En *d*, une cellule endogène pseudo-kystique.

Fig. 2. — Cornée du lapin au 8e jour.

a, pseudo-parasite à un fort grossissement;

b, un polynucléaire intercellulaire.

Fig. 3. — *a*, leucocytes intercellulaires;

b, un fragment de leucocyte;

c, pseudo-parasites intracellulaires;

Fig. 4. — Cette figure montre très bien les formes variées des pseudo-parasites de Guarnieri et surtout les formes actinomorphes. *c*, *c'*.

PLANCHE V

Fig. 1, 2, 3. — Grandes cellules claveleuses sur frottis, coloration par la méthode de Laveran.

Fig. 4 et 5. — Grandes cellules claveleuses sur frottis.

Fixation liquide chromo-acéto-osmique et chlorure de platine, coloration rouge magenta, picro, indigo-carmin.

Fig. 5 et 7. — Grandes cellules claveleuses, fixation alcool absolu, coloration par thionine-tannin.

Fig. 8. — Cellules de l'épithélium d'une pustule vaccinale, substance granuleuse périnucléaire avec leucocytes intracellulaires.

Fig. 9 et 10. — Coupes tangentielles de la capsule de Glisson, au niveau d'une pustule claveleuse hépatique.

Fig. 9. — Dessinée à un grossissement de 3.000 (Apochrom. 1. 5. oc. 18).

En *a*, une cellule claveleuse, noyau vacuolisé, inclusion pseudo-parasitaire;

En *b*, un polynucléaire avec centrosome;

En *c*, une grande cellule contenant des granulations chromatiques très fines, peut-être des bactéries (?), peut-être le microcoque spécifique;

En *d*, on voit le centrosome de la cellule.

Fig 10. — La figure d'ensemble montre la distribution générale des granulations en question dans la capsule de Glisson œdématiée, en pleine lésion claveleuse.

Fig. 11. Coupe tangentielle d'une pustule pulmonaire intéressant la plèvre et les premières alvéoles à épithélium cubique.

Les mêmes granulations sont visibles et très nombreuses, dans le tissu pleural infiltré, au niveau des grandes cellules claveleuses pseudo-parasitées. *b*, *b'*.

En *c*, un leucocyte mononucléaire avec un centrosome dont les dimensions permettent de se rendre compte de la finesse des granulations qui sont en question.

PLANCHE VI

Fig. 1. — Coupe d'une bronche claveleuse au point de jonction de la grosse bronche avec une bronchiole secondaire.

En *A*, l'épithélium proliféré a un aspect ectodermique et filamenteux, les cellules contiennent des inclusions, et le noyau présente la dégénération vacuolaire caractéristique.

En *B*, l'épithélium de la bronchiole ne présente pas d'inclusion.

En *c*, *c*, grandes cellules claveleuses mésodermiques.

Fig. 2. — *Cancer de la souris.*

Coupe d'un poumon cancéreux. — La coupe montre, dans une grosse veine, la présence de nodules cancéreux isolés et libres.

Dans ce cas, les vaisseaux du poumon étaient presque tous farcis de tissu cancéreux métastatique.

Le dessin, très exact, a le caractère d'un véritable schéma; il y a eu transport des cellules cancéreuses de la tumeur sous-cutanée.

Fig. 3. — Coupe d'ensemble d'un fragment d'une tumeur du sein chez la souris, bourgeons épithéliaux avec inclusions intra-cellulaires de différents types.

Fig. 4. — Un tube cylindrique à un fort grossissement, montrant les inclusions intra-épithéliales dans les cellules cancéreuses.

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DE LA CLAVELÉE

FILTRATION DU VIRUS; SÉRO-CLAVELISATION; SÉROTHÉRAPIE

Par A. BORREL

Le virus claveleux existe au niveau de toutes les lésions claveleuses, non seulement dans la pustule d'inoculation et les pustules cutanées, mais aussi dans les organes profonds, différant en cela du virus vaccinal ou variolique, qui cultive seulement au niveau des surfaces ectodermiques.

A cause de cela, l'étude expérimentale de la clavelée est beaucoup plus facile que celle de la variole et devait la précéder.

A la suite de l'inoculation sous-cutanée, il se développe une pustule d'inoculation qui apparaît dès le 4e jour, la température s'élève en même temps et, au 9e ou 10e jour, dans les cas graves, des pustules de généralisation apparaissent sur tout le corps.

Dans la région axillaire ou inguinale correspondant à la pustule d'inoculation, un ganglion se développe, et il est bien certain que la généralisation se fait par la circulation ; le virus passe par le sang pour aller se localiser dans les organes ou à la surface cutanée au niveau des lésions pustuleuses.

Mais la clavelée ne peut pas être considérée comme une maladie septicémique, le virus ne cultive pas et ne reste pas dans le sang; comme l'ont démontré MM. Nocard et Roux, il ne fait qu'y passer.

Bosc a soutenu que le parasite de la clavelée existait dans le sang : il l'y a même vu au microscope. Mais plus tard, à la suite des critiques de Nocard, pour démontrer la virulence du sang, il en a prélevé 200 c. c. sur un agneau, la veille de la généralisation, et il a obtenu une pustule par inoculation : on ne voit pas très bien ce qu'a voulu démontrer Bosc par cette expérience ; il est bien certain que le parasite doit passer à certains moments par la circulation, mais il est non moins certain que le virus ne reste pas dans le sang : le système circulatoire n'est pas le lieu du virus claveleux ; on peut inoculer à tous

les moments de la maladie des quantités notables de sang, sans donner la maladie, ni produire la moindre immunité. Voilà ce qui est démontré par de nombreuses expériences.

Pour démontrer que la clavelée est une maladie septicémique, Bosc aurait dû inoculer, non pas 200 c. c. de sang, mais des quantités beaucoup plus faibles : 1c. c., une goutte, et cela devrait suffire, d'après l'auteur lui-même.

Bosc décrit dans le sang des animaux claveleux un parasite visible au microscope : quelle que soit la patience d'un microscopiste, il est difficile d'examiner sur lame, en préparations microscopiques fixées et colorées, la quantité de sang qui correspond à un centimètre cube ; si l'on constate des parasites à l'examen microscopique, l'inoculation doit réussir à tout coup, à des gouttes, à des dilutions de goutte.

Peut-être le parasite vu et décrit dans le sang n'est-il pas le microbe de la clavelée?

Bosc [1] a soutenu que le ganglion claveleux est toujours virulent ; or, jusqu'à lui, tous les auteurs s'accordent à reconnaître qu'il est rare de trouver la pulpe ganglionnaire virulente. Pour le démontrer, il inocule 2 c. c. de pulpe ganglionnaire : la technique décrite pour se procurer cette pulpe dite virulente laisse soupçonner toutes sortes de contaminations possibles. J'ai fait moi-même plusieurs expériences et seulement, une fois, en inoculant un demi-centimètre cube de pulpe prélevée à la mort de l'animal, au 14e jour, j'ai obtenu une pustule ; j'en suis à me demander, pour ce résultat positif unique, s'il n'y a pas eu de ma part une faute de technique.

Malgré les affirmations de Bosc, nous constaterons, d'accord avec des expérimentateurs qui ont fait leurs preuves, que le ganglion claveleux, comme le ganglion vaccinal, est rarement virulent, que le sang n'est pas le lieu du microbe, que seules sont virulentes, les pustules claveleuses : nous éviterons ainsi de prendre des exceptions pour des règles.

FILTRATION DU VIRUS

Après les travaux de Lœffler sur la fièvre aphteuse, après la découverte du microbe de la péripneumonie par MM. Roux,

1. Bosc, *Soc. de Biologie*, 26 avril 1902.

Nocard et nous-même, il était tout naturel de rechercher si le virus claveleux ne rentrait pas dans ce même groupe des microbes petits, et nous avons étudié la question de la clavelée à ce point de vue.

L'expérience montre que la filtration du virus aphteux ou du microbe de la péripneumonie est d'autant plus difficile que le liquide est plus albumineux. J'ai cherché à obtenir des produits très riches en virus, aussi peu albumineux que possible, et j'ai laissé de côté le *virus claveau*, liquide essentiellement coagulable, très albumineux, difficilement filtrable.

Pour étudier le virus claveleux, au point de vue de la filtration, j'ai utilisé le *raclage superficiel des grosses pustules d'inoculation, recueilli quelques heures après la mort de l'animal et dilué dans de l'eau ordinaire.*

Après la mort de l'animal, les couches superficielles de la pustule sont facilement dissociées, et laissent exsuder peu de sérosité albumineuse; l'absence du sang favorise l'opération. Avec le tranchant d'un scalpel, on racle toutes les couches épithéliales, y compris la région papillaire. Le raclage d'une seule pustule de 5 à 6 centimètres de diamètre est mis en suspension dans 100 c. c. d'eau de conduite; le liquide louche ainsi obtenu est très riche en virus; il peut être dilué au cent millième et davantage; il contient très peu de matières albuminoïdes en solution.

Avant de passer sur les bougies, il est filtré sur papier pour éliminer les éléments cellulaires et les débris qui colmateraient rapidement les pores de la bougie filtrante.

Une expérience première de filtration sur bougie Berkefeld donna un résultat positif, le liquide stérile dans le bouillon ou sur gélose à 37°, se montra virulent.

Je fus amené à étudier de plus près les conditions de cette filtration.

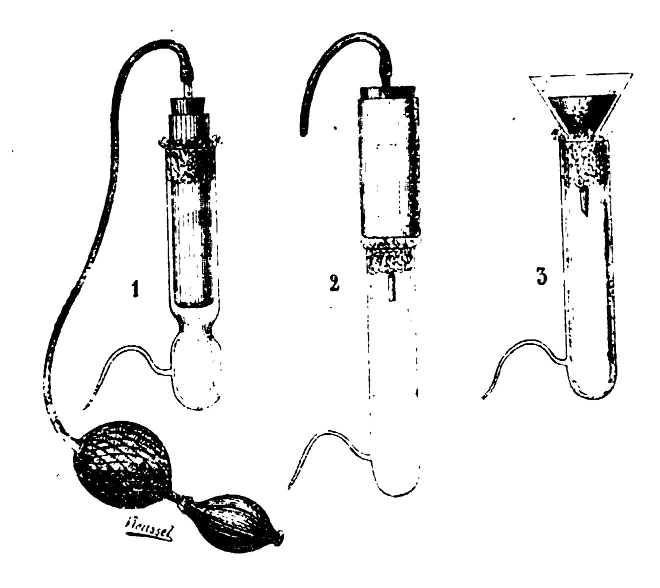
Dans ces expériences de filtration, j'ai utilisé différentes bougies: Chamberland, Berkefeld, et des entonnoirs filtrants en porcelaine d'amiante Garros.

Pour les travaux de laboratoire à l'Institut Pasteur, M. Chamberland avait mis à notre disposition des bougies de porosité variable, que j'ai désignées sous la rubrique F^2, F^3, F^4 et F^{10},

débitant 1, 2, 3 et 10 fois plus, dans la même unité de temps et dans les mêmes conditions, que la bougie F : celle-ci est le modèle courant, répandu dans les laboratoires pour les filtrations ordinaires.

M. Garros nous a fourni des entonnoirs filtrants en porcelaine d'amiante à parois minces, 2 millimètres environ, qui dans les conditions normales retiennent les microbes. Pour être suffisamment poreuse, la porcelaine doit être cuite à température élevée, et l'entonnoir mouillé doit montrer une certaine translucidité. Enfin, j'ai eu aussi à ma disposition des bougies Berkefeld du type commercial ordinaire.

Avec les bougies Chamberland, j'ai employé le dispositif de filtration très simple que montre la figure 1.



Dans un tube à pomme de terre qui porte une effilure de distribution, la bougie est introduite, et le tube est fermé sur la bougie par un tampon de coton.

Grâce à une poire en caoutchouc reliée à la bougie par un tube de verre porté sur un petit bouchon de caoutchouc, on peut filtrer sous pression, et rapidement; le liquide aqueux qui contient le virus filtre très vite.

La figure 2 montre le dispositif employé avec la bougie Ber-

kefeld à monture métallique, de même la filtration est faite sous pression de poire de caoutchouc.

Avec les entonnoirs filtrants Garros, la filtration se fait sans pression, et la figure 3 montre le dispositif utilisé.

Dans le cas d'une filtration rapide, extemporanée, sous pression de poire de caoutchouc, le virus claveleux passe quelquefois à la bougie Berkefeld, 3 fois sur 10 en moyenne; bougies neuves, stérilisées à l'autoclave.

Le virus ne passe jamais à la bougie Chamberland ordinaire F, quelquefois aux bougies F^2, F^3, toujours à partir des bougies F^4, F^5, etc.

Le virus, dans une expérience qui a porté sur dix entonnoirs Garros de 1 à 2 millimètres d'épaisseur, cuits à haute température, a passé 3 fois.

Dans toutes ces expériences, les liquides filtrés ensemencés en bouillon ou sur gélose à 37° ont paru stériles, tandis que le liquide sur le filtre contient beaucoup de microbes raclés sur la peau de mouton, sans précaution aucune d'asepsie.

Pourtant, et j'attire l'attention sur ce point d'une façon spéciale, si la dilution a été faite avec de l'eau du robinet non stérilisée, le filtre laisse passer certains microbes, particulièrement petits, mobiles, des vibrions, des spirilles, qui paraissent et se cultivent très bien dans le liquide filtré lui-même, simplement conservé à la température de 20°.

Ces microbes ne poussent pas dans le bouillon à la température de 37° et, si le milieu filtrat claveleux, macération de cellules épithéliales, n'était pas pour eux un milieu de culture excellent, ils passeraient inaperçus (dans un milieu albumineux, ces microbes ne poussent pas); on pourrait conclure à la stérilité absolue du filtrat.

Il n'en est rien et, dans toutes mes expériences de filtration, chaque fois que le virus claveleux a passé, j'ai eu dans le liquide filtré, au bout de 5 à 6 jours, des cultures de certains microbes, toujours les mêmes, que j'ai désignés sous le nom de vibrions des eaux. Ces microbes sont mis en évidence, macroscopiquement par une légère opalescence du liquide, et microscopiquement par la méthode de coloration de Lœffler (mordant ferro-tannique et fuchsine phéniquée) ; le liquide filtré permet d'excellentes colorations de cils sans le moindre voile.

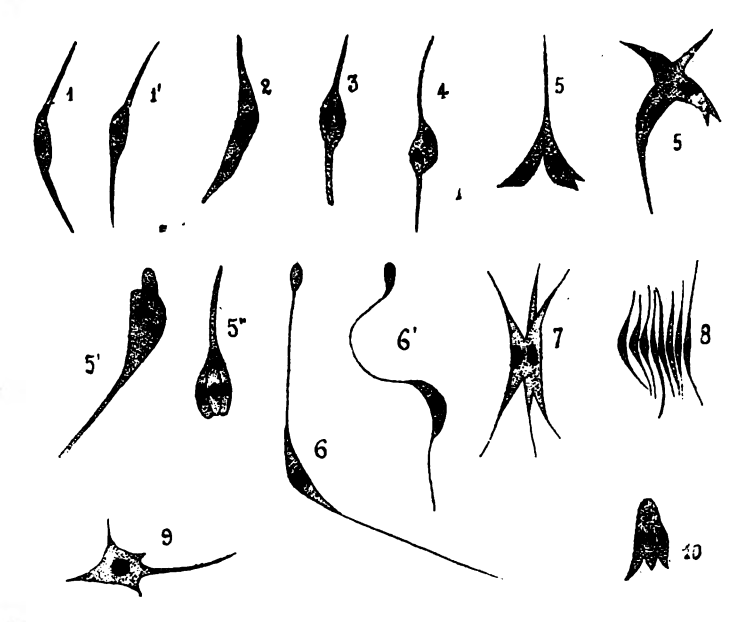
Ceux qui passent le plus ordinairement sont des vibrions très polymorphes dont certains sont à la limite de la visibilité, reconnaissables à leur cil unique. Ces formes sont celles qui passent à travers les pores de la bougie, puis, dans la culture, il se développe des vibrions de dimensions variables, quoique cette culture paraisse tout à fait pure.

Dans d'autres cas, ce sont des formes spirillaires qui passent, et la culture montre de très longs filaments grêles, invisibles à l'état frais, assez semblables aux spirilles de la fièvre récurrente, mais plus courts.

Une fois, j'ai eu la culture pure, dans le filtrat claveleux, d'un microcoque excessivement petit, isolé, en diplocoque, en chainette, en staphylocoque, cultivant en milieu anaérobie, pourvu de nombreux cils vibratiles (8 à 10), culture faite à 37°. Ce microcoque multicilié m'a paru, depuis, particulièrement intéressant et je n'ai pas su le retrouver.

Dans ce même milieu, j'ai obtenu, par filtration, la culture pure d'éléments très particuliers, que je considère comme appartenant au groupe des protozoaires, et que j'ai désignés sous le nom de Micromonas Mesnili.

Le filtrat devient opalescent, et la culture en 5 et 6 jours à 20° est assez abondante. On peut obtenir des colonies sur le milieu filtrat claveleux solidifié par la gélose. Les figures reproduites ci-dessous montrent la morphologie assez particulière de ce microbe : ce sont très ordinairement des éléments ovoïdes allongés, 1/4 μ de largeur sur 3 et 4 μ de longueur, munis de deux cils trapus, plus gros que des cils de bactéries, plus rigides, colorables *directement et sans mordant* par la fuchsine phéniquée. Dans le corps ovoïde du microbe, on distingue un grain chromatique très net, assimilable à un noyau, et colorable par la méthode de Laveran.



Ces éléments se divisent longitudinalement, et les figures montrent les divisions en 2, 3 ou un plus grand nombre d'éléments; les figures 3, 4, 5 sont particulièrement fréquentes et montrent les différents moments de la division précédée de la division du noyau (3). Quelquefois on constate un renflement à l'extrémité d'un cil, 6,6'; des formes pseudo-amœhoïdes peuvent être rencontrées (9).

A cause de la présence définie, à cause des caractères des cils, du mode de division longitudinale qui rapproche cet organisme des flagelles, je suis enclin à le considérer comme un protozoaire; il peut être obtenu en cultures successives.

Ce doit être le plus petit des protozoaires connus.

Tous les microbes observés dans les conditions de filtration ci-dessus sont des microbes mobiles.

Le passage de ces vibrions des eaux servait ordinairement de test au passage du virus claveleux.

Pour avoir le virus claveleux, débarrassé de tout microbe d'impureté, il suffit de faire les dilutions avec de l'eau bouillie; le liquide filtré, stérile dans toutes les conditions de culture jusqu'ici réalisées, est virulent et reste virulent pendant un certain temps.

Dans le cas de filtration rapide, extemporanée, jamais le virus, ni les vibrions des eaux ne passent à la bougie F.

Il en est autrement si, sur la bougie F, on filtre d'une façon continue, de 1 à 7 jours.

J'ai fait deux fois l'expérience, et j'ai constaté que d'abord rien ne passe; mais, au 4e ou 5e jour, des microbes d'impureté, mobiles toujours, et d'abord les vibrions des eaux traversent le filtre, le liquide devient virulent.

Cette étude de la filtration nous montre donc qu'avec le virus, certains microbes traversent les filtres. Ces microbes pourraient passer inaperçus s'ils ne cultivaient pas dans le filtrat; ces microbes, *décelables au microscope*, sont toujours des microbes mobiles, et c'est là un point qui me paraît important à noter: il est certain que le passage de microbes immobiles à travers les filtres doit être beaucoup moins facile; ils peuvent être particulièrement retenus, quelle que soit la petitesse de leur masse, par attraction sur les parois, tandis que des microbes mobiles *à masse négligeable par leur mobilité* peuvent échapper aux lois de l'attraction et passer, sans qu'il soit nécessaire d'admettre une ténuité extrême.

Le passage à travers un filtre n'implique pas forcément l'idée « d'un microbe invisible ».

La filtration du virus claveleux dans les conditions que nous venons de relater, prouve néanmoins et d'une façon certaine que ce virus doit rentrer dans le groupe des microbes petits (bactéries ou protozoaires); les formes coccidiennes décrites dans la vaccine, la variole, la clavelée nous paraissent devoir être définitivement adandonnées, et les recherches doivent être poursuivies dans d'autres directions.

OBTENTION DU VIRUS EN GRANDE QUANTITÉ

Par la filtration avec eau bouillie, nous avons eu un moyen commode et sûr d'obtenir du virus claveleux pur, et l'étude expérimentale du virus en a été beaucoup facilitée.

A défaut de la culture *in vitro*, qui n'a pu être réalisée jusqu'ici, nous avons surtout cherché à obtenir cette culture *in vivo*, dans l'organisme du mouton, en essayant de produire des localisations variées.

Des expériences préalables nous ont montré que le virus inoculé sous la peau ventrale du mouton, est multiplié, déjà dès le 3e jour, avant toute réaction macroscopique locale; au 8e ou 9e jour, la quantité du virus dans la pustule paraît être maximum; il se produit plus tard une forte réaction de l'organisme, qui se traduit par une induration sous-cutanée considérable, au niveau de la pustule; mais la récolte du virus est plus difficile, et on ne gagne rien à attendre la période de sécrétion des pustules.

Par l'inoculation dans la mamelle chez la brebis en lactation, on obtient une lésion grave, et le lait devient virulent; mais cette source de virus n'est pas facilement utilisable, lorsqu'il s'agit d'inoculer de très grandes quantités à un animal en voie d'hyperimmunisation : le lait est difficilement résorbé. Nous avons plus tard inoculé le virus claveleux dans la plèvre, et provoqué artificiellement un épanchement pleural, par inoculation de grandes quantités d'eau physiologique et de mie de pain. Quelquefois on obtient d'excellents résultats; et le liquide pleural extrait après 4 et 5 jours est très virulent; on peut ponctionner et laver la plèvre plusieurs jours de suite, récolter ainsi beaucoup de virus.

Mais toutes ces méthodes d'inoculation sont compliquées, elles donnent des résultats inconstants. Il vaut mieux, dans la

pratique, employer une méthode beaucoup plus simple et plus sûre : celle de l'inoculation sous-cutanée.

J'ai voulu obtenir une énorme pustule d'inoculation et récolter d'une façon tout à fait aseptique les produits virulents.

Pour cela faire, on choisit de préférence une brebis, on l'attache, étendue sur le dos, et on rase toute la surface ventrale, des aines aux aisselles ; puis, avec un injecteur, on inocule sous la peau, au moyen d'une longue canule, 3 à 400 c. c. de liquide virulent tiède (soit 1 c. c. de claveau pur récolté au 8e jour, dilué dans 500 c. c. d'eau physiologique). On porte le liquide très loin avec une aiguille, vers le haut et vers le bas, et on fait ainsi une boule d'œdème qui intéresse une très grande surface ; la brebis est laissée couchée sur le dos pendant 1 heure au moins, jusqu'à résorption complète du liquide ; pendant ce temps, on malaxe la paroi abdominale et on répartit le liquide et le virus sur toute la région abdominale.

Le lendemain et malgré toutes les précautions, le mouton a une grosse boule œdémateuse, au point déclive sous l'abdomen, mais cet œdème se résorbe totalement en 48 heures. — Après 3 jours, la paroi abdominale paraît normale, il n'y a aucune réaction. On remarque, à la fin du 4e jour, un épaississement de la peau et une infiltration sous-cutanée qui se développe rapidement ; c'est la pustule qui commence, et la surface cutanée devient chaude et rouge. Au 6e jour, toute la région abdominale est tendue, épaissie, infiltrée; la pustule d'inoculation, énorme, se développe : elle a 800 c. carrés de surface. Au 7e, 8e jour, elle fait saillie considérable, il n'y a aucun intérêt à attendre plus longtemps ; on doit, à ce moment, procéder à la récolte du virus.

L'animal est sacrifié par piqûre du bulbe et attaché sur le dos. Avec un thermo-cautère, on circonscrit les limites de la pustule par une large bande circulaire de peau brûlée. La peau est disséquée aussi près que possible des couches malpighiennes, raclée par la face profonde; le claveau coule en abondance, il est aspiré à la pipette, tout le tissu œdématié est enlevé aseptiquement, une seule pustule donne 6 à 700 grammes de tissu claveleux.

Le tout est broyé dans un appareil que j'ai déjà décrit dans les *Comptes rendus de la Société de Biologie*[1] ; ce broyeur de

1. *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 20 décembre 1902.

laboratoire, à grande vitesse, exprime le liquide, déchire et réduit en pulpe très fine tout le tissu virulent, qui est mis en suspension dans de l'eau physiologique stérile.

Une seule pustule peut fournir 2 litres de dilution claveleuse, et le virus ainsi récolté est très actif. J'en ai fait l'essai plusieurs fois; au 10/000 et même au 20/000, la dilution est encore virulente; inoculée à la dose de 1 c. c., elle donne une belle pustule.

Un seul mouton pourrait donc fournir de quoi claveliser sûrement plus de 1 million de moutons.

SÉROTHÉRAPIE CLAVELEUSE

Avec de pareilles quantités de virus, nous avons pu hyperimmuniser des animaux, des moutons guéris de la clavelée, et obtenir, à la suite d'inoculations répétées, un sérum actif; les premiers résultats ont été communiqués à la Société de biologie (26 juillet 1902). — Duclert en 1896, en inoculant 190 c. c. de sang pris chez un mouton guéri d'une clavelée grave, avait eu une action préventive du sérum : ces résultats n'avaient pas été confirmés par Nocard. Bosc, dans une note (*Société de Biologie*, 26 avril 1902), disait avoir trois substances immunisantes : une anticlaveline A, une anticlaveline B, une anticlaveline C. — Que sont ces substances? S'agit-il de sérum anticlaveleux? Non, sans doute, car, dit M. Bosc, « le mot séro qui entre dans la composition du mot séro-clavelisation ne préjuge en rien de la nature de ces substances ». Postérieurement à notre communication, Bosc dit avoir obtenu un sérum chez l'âne (*Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, 1er septembre 1902). Il n'est plus question des trois anticlavelines.

Dans mes premiers essais, j'ai utilisé une brebis qui avait été inoculée dans la mamelle et avait eu des lésions graves de l'organe, persistantes sous forme de nodules durs, pendant près de 3 mois.

Le sérum de cette brebis, avant l'hyperimmunisation, n'avait montré aucune action appréciable sur le virus claveleux, soit en mélange, soit préventivement.

Après plusieurs inoculations de liquide pleurétique virulent et de claveau (cinq inoculations de 200 c. c. d'un claveau très actif), on a saigné la brebis et essayé les propriétés du sérum.

L'action du sérum fut des plus nettes. — On peut pour mesurer l'activité du sérum anticlaveleux, l'essayer en mélange avec le virus, ou bien faire des inoculations préventives de sérum, suivies de l'inoculation virulente, à 24 heures d'intervalle.

Pour les essais de sérum par mélange, il faut avoir un virus claveleux aussi homogène que possible, de façon que l'action du sérum ne soit pas entravée par des fragments de tissu virulent ou des coagulums qui protégeraient le virus. Du claveau (*recueilli par la méthode ancienne, ponction de pustule*) est dilué dans du bouillon (3 grosses gouttes de 16 au c. c. pour 10 c. c.); soit dilution à 1/150. La dilution agitée est filtrée sur papier et le filtrat, limpide, est toujours très virulent; une très petite goutte inoculée sous la peau d'un mouton donne une énorme pustule. Pour opérer dans des conditions aussi comparables que possible, j'ai toujours utilisé du claveau du 8e jour.

Dans une expérience, le filtrat virulent fut mélangé, à la dose de 1 c. c., à des doses variables de sérum, 1 c. c., 1/2 c. c., 1/4 c. c., 3 gouttes, 2 gouttes, 1 goutte, et chaque mélange, après 3 heures de contact, fut inoculé, sous la peau, à la seringue, en des points différents sur la face ventrale du mouton préalablement rasé. Sur le même mouton, on inocula la même quantité de virus, sans mélange de sérum, de façon à avoir une pustule témoin; au bout de 8 jours, on peut mesurer exactement l'action du sérum par les dimensions des pustules développées; la pustule témoin a 5 c. c. de diamètre, et les autres sont d'autant plus petites qu'il y a dans le mélange plus de sérum; avec 1/2 c. c. de sérum, il n'y avait même pas de pustule.

On peut ainsi exactement doser et noter même l'action du sérum; à condition que le total du sérum inoculé ne soit pas trop considérable, il n'y a pas d'action générale sur l'organisme du mouton et les pustules gardent leurs dimensions relatives.

Quand le sérum est bon, il suffit de quelques gouttes pour neutraliser d'une façon complète une dose de virus qui, inoculée seule, donne au témoin une pustule énorme.

Avec des doses moindres de sérum, on peut graduer la dimension de la pustule et empêcher d'une façon certaine la généralisation et la maladie générale.

De là une méthode de clavelisation par séro-virus qui me paraît

devoir entrer facilement dans la pratique, dans les pays où la clavelée est endémique.

On peut aussi mesurer l'action du sérum par la méthode préventive : inoculer par exemple, à une série de moutons 2, 5, 10, 15, 20 c. c. de sérum et le lendemain faire une inoculation virulente, en même temps qu'à un témoin.

L'expérience faite avec une dose de virus qui correspond à 1 c. c. de notre dilution (3 gouttes claveau + 10 c. c. bouillon) montre chez le témoin une pustule énorme, de 6 à 7 cent. de diamètre, suivie de généralisation, tandis que les moutons traités préventivement par le sérum ont seulement des pustules locales, plus ou moins développées, ou pas de pustule. Avec des doses de 2, 5, 10 c. c., les pustules se développent, mais petites. Souvent la pustule se décompose en une série de pustulettes discrètes et avortées, l'évolution en est rapide, elles se flétrissent rapidement.

Il suffit de 2 c. c. de sérum pour empêcher la maladie générale; avec 15, 20 c. c. de sérum, il n'y a même pas de réaction locale au point d'inoculation du virus.

On peut obtenir chez le mouton hyperimmunisé des sérums très actifs, et le mécanisme de l'action sur le virus mériterait d'être étudié au point de vue théorique de l'immunité.

Pour l'étude de la sérothérapie anticlaveleuse, au point de vue prophylactique et thérapeutique, j'ai immunisé, depuis bientôt un an, 12 moutons qui, depuis quelques mois, fournissent un sérum actif et utilisable dans la pratique.

Le virus destiné à l'inoculation de ces moutons hyperimmunisés, est récolté par la méthode déjà indiquée ci-dessus :

1 *mouton virus* suffit pour l'inoculation de *12 moutons sérum*. Après 5 à 6 inoculations de 300 c. c. de claveau, le mouton peut être saigné; son sérum est utilisable.

Les saignées sont faites 8 jours et 12 jours après l'inoculation virulente; chaque mois, 2 inoculations virulentes sont faites. Le schema de la vaccination peut être établi ainsi :

Mouton ayant résisté à clavelée grave et guéri.

15 juillet. — 1re inoculation, 200 c. c. claveau. Œdème considérable 2 jours après l'inoculation, résorbé en 8 jours ou 10 jours.

30 juillet. — 2e inoculation, 200 c. c. claveau. Œdème encore notable 2 jours après l'inoculation, résorbé en 6 à 8 jours.

15 août. — 3e inoculation, 300 c. c. claveau. Œdème peu développé, résorbé rapidement.

30 août. — 4e inoculation, 300 c. c. claveau. Pas d'œdème.

15 septembre. — 5e inoculation, 300 c. c. claveau. Pas d'œdème.

Saignée, le 22 septembre, à 500 c. c.

Saignée, le 27 septembre, à 300 c. c.

30 septembre. — 6e inoculation, 300 c. c. claveau. Pas d'œdème ou peu d'œdème.

Saignée, le 7 octobre, à 500 c. c.

Saignée, le 9 octobre, à 300 c. c.

et ainsi de suite.

Les moutons bien nourris, assez gros, supportent facilement ce régime.

On évite les abcès si les manipulations sont bien faites.

Les saignées se font très facilement à la jugulaire; la région étant rasée, l'hémostase faite, on aspire le sang dans un flacon, fermé par un bouchon à deux trous; dans l'un passe un tube d'aspiration, dans l'autre un tube à effilure recourbée qui pénètre directement dans la jugulaire à travers la peau, brûlée légèrement par une pointe de feu, au niveau du trajet de la veine.

Un mouton peut facilement fournir 1 litre de sérum par mois.

J'ai déjà eu l'occasion d'essayer deux fois, dans les conditions de la pratique, sur des troupeaux claveleux, le sérum anticlaveleux, et les résultats ont été parfaits au point de vue thérapeutique.

A Caudry, le 10 octobre, M. Eloire m'informe que la clavelée sévit sur un troupeau parqué en plein champ.

Huit moutons étaient déjà morts, sur un total de 50 moutons; les quarante-deux restants se répartissaient de la façon suivante :

Trois moutons algériens, dont deux avaient de petites pustules visibles sur le museau (ces moutons avaient apporté le virus).

Onze moutons avaient une température rectale au-dessous de 39°,5.

Six moutons avaient une température rectale entre 39°,5 et 40°.

Dix moutons avaient 40°-41°-41°,5. De ceux-là, cinq à six avaient le museau enflé, la vulve rouge, etc.

Sept moutons étaient aux différents moments de la généralisation.

Cinq moutons avaient des croûtes sèches et pouvaient être considérés comme guéris.

11 moutons — 6 moutons — 10 moutons — 7 moutons — 5 moutons

JOURS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
41°,5																									
41°,0																									
40°,5																									
40°,0																									
39°,5																									
39°,0																									

inoculation spontanée — période d'incubation — période fébrile avant éruption — muqueuse rouge — œdème de la face — yeux larmoyants — éruption généralisée — période d'état — pustules rouges — période de sécrétion et dessiccation — pustules suppurées — croûtes

A tous les moutons, vu la gravité du cas, pour éviter, autant que possible, les pertes du malheureux berger, on inocule 40 c. c de sérum.

Le lendemain, une brebis du 3e lot, ayant, le jour de l'inoculation, 41°, les yeux larmoyants, le museau enflé, etc., meurt.

Depuis, aucune mort n'est survenue, et tous les moutons sont restés en bonne santé ou se sont rapidement rétablis.

La température prise deux jours après l'inoculation, le 12 octobre, montra que, dans le lot n° 1, 3 moutons au moins étaient en période d'incubation; les températures, le 12 octobre, étaient pour ces trois brebis : 40°,2-40°,2-40°,5.

La température, prise le 15 octobre, montra que, dans le lot 3, 10 moutons à température élevée (40°-41°) avaient, cinq jours après l'inoculation, 39° à 39°,3. Pas de pustules visibles.

L'avortement de l'éruption claveleuse, sur des moutons ayant déjà une température élevée, s'est montrée de toute évidence.

Cette expérience prouve qu'il est possible de traiter un troupeau en pleine clavelée et d'interrompre, presque d'une façon absolue, la mortalité dans le troupeau. Il est vrai que, dans ce cas, la quantité de sérum employé a été énorme.

Je remercie ici M. Eloire, vétérinaire à Caudry, qui a eu l'extrême obligeance de m'aider d'une façon très effective en plein champ et par un temps plutôt désagréable.

Les températures ont été prises à deux reprises par M. Eloire, et j'ai été tenu au courant des résultats constatés par lui.

Une autre expérience a été faite à Honnecourt, dans le troupeau de M. Anselin, le 1er novembre 1902.

Les animaux se répartissaient de la façon suivante : 154 têtes

1° 36 brebis mortes;

2° 20 en période de pustulation (4 brebis couchées) ;

3° 37 plus ou moins prises, écoulement du nez, roncnus pulmonaires, muqueuses rouges, œdème de la face ;

4° 25 paraissant tout à fait saines;

5° 36 à pustules sèches, en voie de guérison.

Les quatre premiers lots reçoivent 20 c. c. de sérum, ainsi que 9 du lot 5, soit 91 brebis traitées.

La température, le mauvais temps et le nombre de têtes à inoculer en moins de deux heures n'ont pas permis la prise des températures; l'expérience a été faite en bloc, avec le concours de M. Stowb, vétérinaire départemental, et M. Mignot, vétérinaire à Gouzeaucourt. Je les remercie ici.

Le résultat a été parfait, puisque aucune brebis n'a succombé, et les malades se sont rapidement rétablis.

Ces résultats sont encourageants; les expériences montrent que la dose de 20 c. c. est plus que suffisante pour arrêter la mortalité dans un troupeau en pleine infection.

Je compte essayer, à la prochaine occasion, le sérum anticlaveleux à des doses plus faibles, et j'espère obtenir des résultats satisfaisants avec 10 c. c., 5 c. c. de sérum.

Il est tout indiqué, d'ailleurs, de varier les doses avec la gravité du cas et d'employer une plus ou moins grande quantité de sérum, suivant le degré d'infection du troupeau.

Sous l'influence du sérum, la convalescence des malades est d'ailleurs raccourcie, et le propriétaire est sûr de trouver son bénéfice à employer des doses plus fortes de sérum.

La clavelée est assez fréquente dans certaines régions en France et dans beaucoup d'autres pays ; on sera rapidement fixé sur la valeur thérapeutique de la méthode.

De la fixation de la toxine tétanique par le cerveau

Par le Dr BESREDKA.

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

A peine M. Ehrlich eut-il esquissé les grandes lignes de son ingénieuse théorie de l'immunité, que MM. Wassermann et Takaki firent connaître leurs expériences, devenues classiques depuis, sur la neutralisation de la toxine tétanique par la substance cérébrale.

Ce fut une date importante dans l'histoire de la théorie de Ehrlich : les résultats obtenus par MM. Wassermann et Takaki parurent au premier abord tout à fait surprenants; comme en même temps ils semblaient découler naturellement des idées que M. Ehrlich venait d'émettre sur la nature des antitoxines, la nouvelle théorie des chaînes latérales s'imposa aussitôt à l'esprit.

Nous ne dirons pas ici quelle a été l'évolution ultérieure de cette théorie, qui s'est beaucoup étendue depuis et quelque peu modifiée sous la pression de nouveaux faits. La présente note n'a d'autre objet que d'analyser de près le phénomène de MM. Wassermann et Takaki, phénomène qui constitue une des bases fondamentales de la théorie de M. Ehrlich.

Si le cerveau de cobaye est capable de neutraliser, *in vitro*, à l'exclusion de tout autre organe, une dose même dix fois mortelle de toxine tétanique, cela tient, d'après les savants allemands, à ce que cet organe, comme le plus sensible à la toxine et le premier attaqué par elle, renferme des chaînes latérales spécifiques, se combinant avec cette toxine ; en d'autres termes, à l'état normal le cerveau renfermerait déjà une certaine dose d'antitoxine tétanique, identique à celle que l'on trouve dans le sérum des animaux immunisés contre la toxine tétanique.

Cette interprétation du phénomène de Wassermann cadrait si bien avec l'idée des chaînes latérales, qu'elle est devenue bientôt une certitude pour M. Ehrlich et les adeptes de sa doctrine.

Cette interprétation répond-elle effectivement à la réalité?

La toxine tétanique se trouve-t-elle réellement neutralisée par le cerveau à la faveur de la vraie antitoxine y présente, ou bien ne serait-ce pas plutôt à la faveur d'une autre substance qui, sans être l'antitoxine tétanique, pourrait cependant, par un mécanisme d'ailleurs tout différent, paralyser l'action nuisible de la toxine?

Ce n'est pas, du reste, la première fois que la question s'est posée sous cette forme. Peu de temps après l'apparition du mémoire de MM. Wassermann et Takaki, notre maître, M. Metchnikoff, a fait une étude approfondie de cette question.

En se basant sur ses nombreuses expériences, ainsi que sur celles faites dans son laboratoire par M. Marie, M. Metchnikoff conclut que l'action du cerveau est « une action limitée dans l'espace et dans le temps[1] », et comme telle ne peut pas être comparée à celle du sérum antitétanique. Il a démontré en plus que la matière cérébrale ne détruit par la tétanine, et si celle-ci, mise en présence de la substance cérébrale, ne produit pas d'action, c'est que la toxine se trouve dans ce cas absorbée par les macrophages, et que sa diffusion vers les centres nerveux devient dès lors impossible.

M. Marie, en résumant ses intéressantes recherches sur le phénomène de Wassermann, déclare que « l'on ne saurait en aucune façon l'interpréter dans le sens d'une fonction antitoxique, au sens vrai du mot ».

Un peu plus tard, M. Danysz a conclu dans le même sens après avoir constaté que la toxine tétanique qui avait été fixée sur la substance cérébrale, pouvait devenir libre après la macération du cerveau dans l'eau physiologique.

D'un autre côté, M. Marx, de l'Institut de Francfort, s'est proposé récemment de réfuter les conclusions de M. Kitachima, élève de M. Behring, et de prouver que dans l'expérience de Wassermann le cerveau n'agit qu'en raison de son pouvoir antitoxique, comme le soutiennent MM. Ehrlich et Wassermann.

M. Marx a constaté ceci : soit un mélange de cerveau et de toxine tel que celle-ci n'est pas complètement neutralisée; ajoutons à ce mélange une dose d'antitoxine qui par elle-même est insuffisante pour neutraliser toute la toxine présente; ce nouveau mélange (toxine + cerveau + antitoxine) injecté à une

1. Voir le mémoire de Marie, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1898, p. 91.

souris est tout à fait inoffensif; en d'autres termes, l'action du cerveau s'est additionnée à celle du sérum antitoxique pour amener la neutralisation complète de la toxine. Cette expérience, réalisée avec beaucoup de soin, est à l'abri de toute objection; mais où nous ne sommes pas du tout de l'avis de M. Marx, c'est lorsqu'il s'agit de son interprétation; car du fait que le cerveau et l'antitoxine du sérum peuvent, se trouvant ensemble, fixer plus de toxine que chacune de ces substances isolément, l'auteur conclut à leur identité, c'est-à-dire à la présence de l'antitoxine dans le cerveau. Or, il nous est impossible de souscrire à cette conclusion pour cette simple raison que deux substances peuvent agir dans le même sens, additionner leurs effets, sans pour cela être le moins du monde identiques.

Quoi qu'il en soit, la question est encore sur le tapis[1] et quelques faits observés à l'occasion d'autres recherches nous ayant démontré qu'il s'agit là, comme l'avaient soutenu M. Metchnikoff et ses élèves, d'une action non-antitoxique, nous nous sommes décidé à en faire le sujet d'un petit mémoire.

I

Prenons un cerveau de cobaye venant d'être extrait de la boîte crânienne; réduisons-le, en le broyant sur une toile métallique, à la consistance d'une pâte, de façon qu'il forme, délayé dans de l'eau physiologique, une émulsion très fine et homogène. Ceci fait, ajoutons à cette émulsion une grande quantité de toxine tétanique fraîchement préparée (2-3 c. c.), et laissons le tout à la glacière pendant 6 heures ou 1, 2, 3 jours.

Comme nous avons tout lieu de croire que la dose de toxine tétanique ajoutée est notablement supérieure à celle qui peut se fixer sur le cerveau, et qu'il reste, par conséquent, de la toxine libre dans le liquide ambiant, nous soumettons notre mélange de cerveau et de toxine à l'action de la turbine (5-6 fois), en remplaçant chaque fois le liquide surnageant par de l'eau physiologique à 7,5 0/00.

1. Voir Ludwig Aschoff, *Zeitschr. für allgem. Physiol.* 1902.
2. La toxine tétanique dont nous nous sommes servi tuait la souris à la dose de 0,005 c. c. en 36 heures; elle nous a été fournie par le docteur Louis Martin, chef de laboratoire à l'Institut Pasteur, et son collaborateur, le docteur Momont; je les prie d'accepter mes très vifs et sincères remerciements.



Après un certain temps, toute la toxine libre doit se trouver éliminée par ces lavages répétés.

Lorsqu'on juge l'opération terminée, on retire au moyen d'un tube effilé toute la partie liquide et on prélève, de l'intérieur de la pâte cérébrale restée au fond du tube, et débarrassée complètement de liquide, 1 ou 2 gouttes d'émulsion. Ceci fait, on délaye cette dernière dans un peu (1 c. c. environ) d'eau physiologique et l'on injecte le tout sous la peau du dos ou sous la peau de la cuisse d'une souris. 16 heures à peine après le moment de l'injection, cette souris présentera les symptômes caractéristique du tétanos, à évolution rapide et tuant l'animal en 24-30 heures, avec des signes du tétanos généralisé.

On pouvait se demander si l'effet de cette inoculation ne devait pas être attribué simplement à ce que l'émulsion injectée contenait un peu de toxine libre présente dans le liquide où baignait la matière cérébrable. Il est facile de prouver que cette hypothèse doit être rejetée. En effet, sur les 2 gouttes de matière cérébrale inoculées, il pourrait s'y trouver, au maximum, 1/2 goutte ou 1 goutte de liquide de lavage; or, l'expérience montre que si le lavage a été conduit avec soin[1], l'inoculation même de 20 gouttes de l'eau du dernier lavage ne donne pas de symptômes tétaniques.

Si l'on injecte plus de liquide, on voit souvent le tétanos se déclarer au bout de 2-3 jours, et cela par suite de la diffusion de la toxine fixée sur le cerveau dans le liquide ambiant; il est évident que cela n'est pas à comparer avec le tétanos foudroyant produit par 1 ou 2 gouttes de la masse cérébrale.

Il est donc certain que, dans ce dernier cas, c'est bien la toxine fixée qui tue et non pas celle qui aurait pu se trouver à l'état libre.

Nous voici donc en présence d'un fait qui va à l'encontre des notions généralement adoptées.

En effet, jusqu'à présent tous les auteurs qui ont répété les expériences de MM. Wassermann et Takaki ont été unanimes à constater l'action protectrice du cerveau, et voici que dans

1. Nous insistons sur la nécessité de continuer les lavages jusqu'à ce que le liquide devienne absolument clair, car si celui-ci contient en suspension des particules même très fines de cerveau, le résultat de l'expérience peut être faussé, comme cela va sans dire, par la présence de la toxine fixée sur les particules en question.

notre expérience le cerveau ne protège plus, mais donne, par contre, à l'animal le tétanos, tout comme la toxine pure.

Cette contradiction n'est en réalité qu'apparente et s'explique d'une manière bien simple.

MM. Wassermann et Takaki, ainsi que tous ceux qui ont étudié le phénomène en question, employaient de faibles doses de toxine, ne dépassant généralement pas 10-15 doses mortelles, et lorsqu'ils arrivaient à la dose limite à laquelle le cerveau ne protégeait plus, ils se contentaient de signaler le fait sans se préoccuper du sort de cette toxine ajoutée en excès, ou plutôt ils croyaient que dans ce cas c'était la toxine non fixée, soit la toxine libre qui déterminait les symptômes tétaniques.

Or, quand on examine ce phénomène de près, il est facile de s'assurer que les choses ne se passent pas ainsi ; en réalité, l'excès de toxine ajoutée n'est pas libre, toute la toxine se trouve fixée sur le cerveau ; mais le fait est que le pouvoir protecteur et le pouvoir fixateur du cerveau ne vont pas de pair, le cerveau pouvant fixer beaucoup plus de toxine qu'il n'est capable d'en neutraliser. Et voici pourquoi le cerveau de cobaye, qui fut saturé de toxine tétanique dans notre expérience, donnait à tout coup le tétanos foudroyant, sans que cette mort pût être attribuée à la toxine libre de la masse injectée.

Mais alors nous sommes autorisé à admettre, avec MM. Ehrlich, Wassermann et tous les partisans de la théorie des chaînes latérales, qu'il existe dans le cerveau une véritable antitoxine tétanique, neutralisant l'effet de la toxine ; s'il en était ainsi, cette antitoxine n'aurait dû se combiner qu'avec la quantité de toxine juste nécessaire pour sa neutralisation ; elle ne devrait pas avoir de l'affinité pour une dose supérieure de toxine à tel point que le mélange pût devenir franchement toxique et meurtrier.

N'est-il pas plus naturel d'admettre que la matière cérébrale possède vis-à-vis de la toxine tétanique une propriété fixatrice analogue à celle que l'on constate à un degré plus faible dans le carmin, par exemple, en un mot, dans une substance non spécifique? Le phénomène de Wassermann, tout en gardant son intérêt, cesse dès lors d'être une preuve de la présence des chaînes latérales spécifiques ou d'antitoxine tétanique préexistante dans le cerveau.

II

Autre expérience, qui prouve que la toxine tétanique ne fait qu'adhérer à la masse cérébrale sans entrer avec celle-ci dans une combinaison tant soit peu stable.

Prenons le cerveau sursaturé de toxine tétanique, comme il a été indiqué tout à l'heure, et que nous allons appeler, pour être plus bref, « cerveau toxique » ; faisons agir sur lui une certaine quantité de sérum antitétanique provenant d'un cheval fortement immunisé :

$$\frac{\text{Cerveau} + \text{toxine}}{\text{ou cerveau toxique}} + \text{Antitoxine.}$$

Après avoir laissé le mélange en contact pendant une nuit à la glacière, soumettons-le à des lavages répétés au moyen de centrifugations afin d'en chasser les dernières traces de l'antitoxine ajoutée.

Quand on juge le lavage terminé, on injecte les dernières eaux de lavage (1-2 c.c.) à quelques souris pour s'assurer qu'elles ne possèdent plus aucune propriété protectrice — ni préventive ni antitoxique — vis-à-vis de la dose mortelle minima de toxine.

Ceci établi, il reste à savoir quelles sont les propriétés du cerveau ainsi traité, et que nous allons désigner sous le nom de cerveau « toxo-antitoxique ».

Il y a lieu de se demander si l'antitoxine ajoutée en dernier lieu est entrée en combinaison chimique avec le cerveau toxique, ou bien si elle avait rencontré en ce dernier une combinaison si stable qu'elle n'a pu exercer aucune action sur lui et a été ensuite éliminée au cours des lavages à la turbine.

Pour résoudre cette question, il faut voir comment se comporte ce cerveau « toxo-antitoxique » *in vivo*, injecté à la souris, puis *in vitro*, en présence de la toxine.

Pour avoir un terme de comparaison, un autre cerveau de cobaye a été soumis exactement au même traitement que le cerveau toxo-antitoxique, avec cette seule différence qu'au lieu de toxine, nous avons ajouté du bouillon qui sert à la préparation de cette toxine; pour tout le reste, — nombre des centrifugations, quantité d'antitoxine et d'eau de lavage ajoutées, — il a été procédé identiquement de la même façon dans les deux cas.

Ainsi, à côté d'un

cerveau-toxine-antitoxine

nous avons eu un témoin :

cerveau-bouillon-antitoxine.

Sans entrer dans les détails des expériences, nous allons résumer brièvement les résultats obtenus :

1. Le cerveau toxo-antitoxique, contrairement au cerveau toxique, injecté même à des doses élevées, est tout à fait inoffensif pour la souris, tout comme le cerveau témoin;

2. Le cerveau toxo-antitoxique se comporte au point de vue de ses propriétés préventives ou antitoxiques comme le cerveau normal ;

3. Le cerveau toxo-antitoxique, mis en présence d'une nouvelle quantité de toxine tétanique, se comporte tout à fait comme un cerveau normal; il protège la souris contre la toxine tétanique à la même dose que le cerveau témoin, et, en plus, il est capable de fixer, comme le cerveau témoin, une quantité de toxine beaucoup plus forte, donnant un tétanos foudroyant à une souris.

Bref, le cerveau saturé successivement par la toxine et l'antitoxine redevient un cerveau tout à fait normal et ne garde aucune trace du traitement subi.

Ceci posé, il est très facile de reconstituer le mécanisme de cette transformation.

A la suite de l'addition du sérum antitoxique au cerveau toxique, il s'était passé ceci : toute la toxine qui était fixée sur le cerveau a complètement abandonné celui-ci et est venu se combiner avec l'antitoxine.

Eh bien, s'il existait dans le cerveau une véritable antitoxine fixant la toxine tétanique, on ne comprendrait pas pourquoi une nouvelle quantité d'antitoxine, ajoutée au cerveau toxique, viendrait défaire une combinaison déjà faite dans les mêmes conditions; il ne reste qu'à admettre *que la substance qui fixe la toxine dans le cerveau*, ne possédant pour cette dernière qu'une affinité faible, *n'est pas la véritable antitoxine*.

Ce n'est pas tout. Le cerveau toxique traité par le sérum antitétanique et bien lavé ensuite à la turbine dans de l'eau physiologique, récupère tout son pouvoir primitif de fixer de nouveau la toxine tétanique (nous avons fait dans ce but des dosages comparatifs avec le cerveau normal); il est donc clair que le cerveau

n'avait subi aucune modification pendant qu'il était en contact avec la toxine tétanique.

Nous avons répété cette expérience plusieurs fois en variant la durée du contact de la matière cérébrale et de la toxine (jusqu'à 3 jours), et nous avons dû reconnaître que la puissance fixatrice du cerveau était invariablement la même dans toutes les conditions.

La conclusion qui se dégage est donc celle que l'action du cerveau vis-à-vis de la toxine n'est pas du tout comparable à celle de l'antitoxine vraie vis-à-vis de sa toxine, et que, par conséquent, dans le phénomène de Wassermann, il faut voir toute autre chose qu'une manifestation antitoxique, au sens propre du mot; on ne peut donc pas invoquer ce phénomène à l'appui de la théorie de M. Ehrlich.

Nous venons de dire que lorsqu'on ajoute à un cerveau saturé de toxine une certaine quantité de sérum antitoxique, on voit aussitôt toute la toxine fixée déserter le cerveau pour venir se combiner avec l'antitoxine du sérum. Dans cette expérience nous avons employé de l'antitoxine tétanique ordinaire, c'est-à-dire celle qui est fournie par le cheval.

On aurait pu se demander si ce fait ne constitue pas une cause d'erreur, l'affinité de l'antitoxine fabriquée par le cheval pour la toxine, pouvant être plus puissante que celle qui existe entre cette même toxine et l'antitoxine fournie par le cobaye, dans la supposition que c'est l'antitoxine tétanique qui est la substance active dans le cerveau de cobaye.

Cerveau de cobaye. (Antitoxine? de cobaye.)		Sérum de cheval. (Antitoxine de cheval.)
I_____________	Toxine.	_____________I

Cette objection a pu être levée par l'expérience suivante.

Au lieu de nous servir de sérum antitétanique de commerce, nous nous sommes adressé à du sérum de lapin immunisé [1] depuis plusieurs mois contre la toxine tétanique; en même temps, au lieu de prendre le cerveau du cobaye, nous avons pris celui de lapin.

Cerveau de lapin. (Antitoxine? de lapin.)		Sérum de lapin. (Antitoxine de lapin.)
I_____________	Toxine.	_____________I

1. Ce lapin a été mis aimablement à notre disposition par le docteur Dmitrievsky.

Avec ces trois éléments — cerveau de lapin, toxine tétanique, antitoxine de lapin — nous avons refait toutes les expériences exposées plus haut : après avoir établi le pouvoir fixant du cerveau de lapin qui est notablement inférieur à celui de cobaye, nous l'avons saturé avec de la toxine, puis nous avons fait agir sur lui du sérum antitétanique du lapin; il va de soi que nous avons eu soin, après chaque opération, de débarrasser le cerveau par des lavages répétés, tantôt d'excès de toxine, tantôt d'excès d'antitoxine. La masse cérébrale ainsi obtenue est redevenue capable de fixer une nouvelle quantité de toxine, tout comme un cerveau normal de lapin.

Il s'ensuit donc que la toxine tétanique, mise en présence de deux substances — vraie antitoxine de lapin, d'une part, et cerveau de lapin, d'autre part, — n'a pas hésité à abandonner le cerveau pour aller se combiner avec la vraie antitoxine.

A cela, peut être, pourra-t-on objecter ceci : le sérum antiétanique et la masse cérébrale peuvent bien renfermer qualitativement la même anti-toxine, mais si ces substances agissent différemment dans le cas cité, cela est dû à la dose inégale d'anti-toxine ajoutée; ne savons-nous donc pas que M. Madsen guérit des globules rouges imprégnés de toxine tétanique en faisant agir sur eux de très fortes doses de sérum anti-toxique, alors qu'il échoue avec des doses de sérum moins fortes.

Cette objection ne peut pas cependant être appliquée à notre cas. En effet, si dans certaines conditions la question de masse doit entrer en ligne de compte, l'exemple des globules tétaniques de M. Madsen n'offre qu'une analogie très éloignée avec celui du cerveau toxique.

Là, la toxine tétanique a à choisir entre l'antitoxine spécifique et un récepteur indifférent des globules rouges, ou, du moins, un récepteur qui n'a pas d'action neutralisante comme le cerveau, et sa préférence pour l'antitoxine est donc toute naturelle, surtout si on considère que les globules rouges n'avaient pas été longtemps en contact avec la toxine[1]. Il en devrait être tout

1. L'action curative de l'antitoxine tétanique vis-à-vis des hématies chargées de toxine tétanique, ne se manifeste que lorsque le contact entre les hématies et la toxine n'a pas dépassé 1 ou 2 heures; or, dans notre cas, on a beau laisser le cerveau et la toxine en contact pendant même plusieurs jours, aussitôt que l'on y ajoute un peu de sérum antitoxique, le cerveau se dépouille complètement de sa toxine et revient au même état dans lequel il était normalement avant l'addition de la toxine; même sous ce rapport, par conséquent, les deux phénomènes ne sont pas comparables.

autrement dans notre cas si le cerveau renfermait réellement la même substance que le sérum spécifique; la toxine une fois combinée avec l'antitoxine présumée du cerveau, n'aurait aucune raison, et surtout après plusieurs jours (3 jours) de contact de lâcher le cerveau pour l'antitoxine du sérum; et si elle le fait, comme le montre l'expérience, c'est que dans notre cas il s'agit non d'une action antitoxique, mais d'une simple fixation tout à fait comparable à celle de la ricine sur les globules rouges qu'on peut facilement défaire, comme l'a montré M. Rehns, par l'addition du sérum antiricinique.

A titre de curiosité, nous pouvons ajouter que la masse cérébrale revient *ad integrum* même après avoir subi le traitement ci-dessus décrit deux fois de suite : ainsi, dans une expérience, après avoir saturé un cerveau de cobaye de toxine et ajouté d'antitoxine, nous l'avons saturé une seconde fois de toxine, lavé et traité une seconde fois par l'antitoxine; le pouvoir fixateur de la masse cérébrale, bien lavée à la turbine, se montra de nouveau aussi élevé (déterminé par le dosage) que celui du cerveau normal vis-à-vis de la toxine.

De l'ensemble des faits exposés, il résulte que :

1° La masse cérébrale est capable de fixer plus de toxine tétanique qu'elle n'est capable d'en neutraliser; la substance fixatrice du cerveau n'est donc pas la substance antitoxique, au sens propre du mot;

2° La masse cérébrale saturée de toxine tétanique récupère toute son intégrité primitive après l'addition de la vraie antitoxine, que celle-çi provienne d'un animal de même espèce ou d'une espèce différente; la combinaison du cerveau et de la toxine ne présente donc pas une stabilité comparable à celle qui existe entre la toxine et sa vraie antitoxine;

3° Le phénomène observé par MM. Wassermann et Takaki doit donc être attribué à la présence dans la matière cérébrale d'une substance particulière, autre que la vraie antitoxine tétanique, et ne peut, par conséquent, servir d'appui à la théorie des chaînes latérales de M. Ehrlich.

Juillet 1902.

RECHERCHES
SUR LES "PROPRIÉTÉS ANTITÉTANIQUES" DES CENTRES NERVEUX DE L'ANIMAL IMMUNISÉ

Par M. K. DMITRIEVSKY

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

D'après la théorie de Ehrlich, les éléments cellulaires de l'organisme vivant possèdent des chaînes latérales dont la propriété spécifique est d'attirer les toxines et de les neutraliser. A la place des chaînes latérales (récepteurs) combinées avec des molécules de toxine et devenues ainsi incapables de remplir leur fonction physiologique normale, les cellules en fabriquent de nouvelles, et toujours en excès. Les cellules chargées d'un trop grand nombre de chaînes latérales s'en débarrassent en les rejetant dans le sang, où elles ne tardent pas à manifester leur affinité chimique pour la toxine et à jouer ainsi le rôle de véritables antitoxines.

D'après cette théorie, on doit admettre que l'antitoxine tétanique existe dans les cellules nerveuses de l'organisme normal, et que l'immunisation fait apparaître dans ces cellules un nombre considérable de chaînes latérales qui sont rejetées dans le courant circulatoire.

C'est guidés par ces considérations que Wassermann et Takaki[1] ont fait leurs intéressantes recherches sur le cerveau de différents animaux. Ces recherches ont montré que la substance cérébrale de cobaye, mélangée à du poison tétanique, atténue et même supprime l'action nocive de ce dernier. Un c. c. d'émulsion de cerveau (les auteurs trituraient dans un mortier du cerveau de cobaye mélangé à 10 c. c. d'eau physiologique) préserve la souris contre une dose dix fois mortelle. La même dose d'émulsion manifeste une action empêchante, lorsqu'elle est injectée mélangée à une dose 60 fois mortelle de poison tétanique.

1. *Berliner klin. Wochenschr.* 1898, n° 1.

L'action de la moelle épinière est plus faible. Ainsi, 1 c. c. d'émulsion (la moelle est triturée avec 3 c. c. d'eau physiologique) ne préserve la souris que contre une dose 3 fois mortelle.

Un animal ne périt pas à la suite de l'injection d'une dose 3 fois mortelle de toxine tétanique, s'il a reçu la veille, à titre préventif, de l'émulsion de cerveau.

Cette propriété de neutraliser le poison, de le rendre inactif n'appartient qu'aux parties solides du cerveau. Le liquide de filtration du cerveau, non plus que le liquide céphalo-rachidien, n'ont aucune action sur la toxine tétanique.

En se basant sur ses expériences, Wassermann a émis l'hypothèse que les centres nerveux des animaux normaux renferment une substance antitoxique, absolument semblable à l'antitoxine trouvée par Behring et Kitasato dans le sang d'animaux immunisés contre le tétanos. D'après lui, l'antitoxine du cerveau normal, injectée à la souris, diffuse dans l'organisme, où elle rencontre le poison tétanique qu'elle neutralise de la même façon que le sérum antitétanique.

Les recherches de Wassermann et Takaki sur l'action de la substance cérébrale sur la toxine tétanique ont été confirmées par celles de Ransom[1] sur les animaux vivants.

Peu de temps après le travail de Wassermann et Takaki paraît le mémoire de M. le professeur Metchnikoff[2]. Ce savant, tout en confirmant ses observations sur l'action du cerveau de tortue et de celui de poule sur la toxine tétanique, publiées déjà en 1897, confirme les recherches de Wassermann et de Takaki, mais en faisant remarquer que l'action antitétanique des centres nerveux est un privilège des mammifères. La poule a des centres nerveux beaucoup moins efficaces ; les tortues ne produisent qu'un effet très faible ; les grenouilles ne manifestent aucune action antitétanique.

Dans ce travail, M. Metchnikoff expose également les résultats de ses expériences sur le cerveau d'animaux immunisés. Après une ablation partielle du cerveau, le sang des animaux devient plus riche en antitoxine ; le cerveau et la moelle épinière ont manifesté, dans ce cas, une propriété antitoxique égale ou notablement plus faible que le sang et les autres liquides de

1. *Deutsche med. Woch.* 1898, n° 5.
2. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1898, p. 91.

l'organisme. Les centres nerveux ont présenté un pouvoir antitétanique dix fois plus faible que le sang et l'exsudat péritonéal. Le foie est dix fois plus antitoxique que les centres nerveux.

M. Marie[1] a montré, dans un travail exécuté au laboratoire de M. Metchnikoff, ce fait intéressant, que l'action antitoxique de la substance nerveuse ne se répand pas, même à faible distance; cette action est strictement locale. « Il suffit d'introduire sous la face dorsale de la cuisse d'un cobaye de la substance cérébrale en quantité suffisante pour neutraliser une dose plusieurs fois mortelle de la toxine tétanique, et, sous la peau de la face ventrale de la même cuisse, la dose mortelle de cette toxine, pour que le cobaye prenne le tétanos mortel. »

Plus tard, MM. Roux et Borrel[2] ont démontré que l'injection de toxine tétanique, même en petite quantité, dans le cerveau de lapin, amène chez lui le tétanos cérébral typique suivi de mort. On observe ce fait aussi bien chez les animaux neufs que chez les animaux immunisés. Cependant, le même poison, mélangé *in vitro* avec de la substance cérébrale, devient inactif. La résistance du lapin à la toxine tétanique injectée dans les conditions habituelles, ne tient donc pas, d'après Roux et Borrel, à une sensibilité relative des centres nerveux.

Dans la communication au Congrès international d'hygiène à Madrid, M. Metchnikoff, en se basant sur ses expériences personnelles ainsi que sur celles de Roux et Borrel, de Marie, de Knorr et d'autres, dit : « Cette série de faits prouve une localisation étroite dans l'action de la matière cérébrale et en même temps démontre la grande différence entre le phénomène et l'action du sérum antitétanique. »

M. Danysz[3] a confirmé, en 1899, le fait indiqué antérieurement par Knorr, à savoir que la substance nerveuse perd toute son affinité pour la toxine, une fois émulsionnée dans l'eau salée à 10 0/0. Il a montré en même temps que « la toxine primitivement fixée par la substance nerveuse redevient libre *in vitro* et *in vivo*. Les mélanges neutres de toxine et de substance nerveuse deviennent, avec le temps, de plus en plus toxiques, tandis qu'au contraire les mélanges toxiques de toxine et d'anti-

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1898, t. XII, p. 91.
2. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1898, p. 225.
3. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1899, p. 156-157.

toxine deviennent avec le temps moins toxiques, ainsi que cela résulte des expériences de Knorr. »

Comme on le voit, d'après le résumé des travaux indiqués plus haut, on n'a encore exécuté que peu d'expériences pour la démonstration des propositions suivantes.

Si les centres nerveux contiennent une antitoxine tétanique, et si celle-ci est rejetée dans le sang, on doit trouver : 1° que la substance cérébrale contient à un certain moment une quantité plus grande d'antitoxine que n'en renferment le sang et les autres organes : 2° que le cerveau des animaux immunisés est plus riche en antitoxine, à un certain moment de l'immunisation, que le cerveau normal.

M. le professeur Metchnikoff nous a proposé de chercher à déterminer la quantité d'antitoxine dans le cerveau des animaux ayant subi une immunisation plus ou moins longue, et à voir si l'antitoxine tétanique « s'accumule » dans le cerveau des animaux immunisés. Nous avons porté nos expériences sur les cobayes. Nous leur injections des mélanges de la substance cérébrale de cobaye immunisé et du poison tétanique.

Remarquons en passant que, d'après le conseil de M. Metchnikoff, nous triturions avec une baguette de verre le cerveau des animaux saignés à blanc sur un tamis en toile métallique placé sur un verre à pied stérilisé. Nous avons opéré ainsi dans des conditions d'asepsie complète.

Nous préparions à part des émulsions avec : 1° des hémisphères cérébraux, 2° les bases du cerveau avec le cervelet, 3° le bulbe non séparé de la portion supérieure de la moelle. Nous pesions séparément toutes ces parties des centres nerveux, avant de les émulsionner dans de l'eau physiologique.

Une série d'expériences préliminaires nous a convaincu que le cerveau des animaux normaux rend inactive une quantité à peu près fixe de poison tétanique, pourvu qu'on emploie la toxine de la même préparation et qu'on opère sur des animaux dans les mêmes conditions.

Au printemps, pour neutraliser une dose de toxine tuant le cobaye en 6 à 7 jours, nous prenions d'ordinaire 0gr,02 à 0gr,03 des hémisphères cérébraux du cerveau normal; 0gr,15 à 0gr,2 de la base du cerveau avec le cervelet ; 0gr,2 à 0gr,3 du bulbe avec la partie supérieure de la moelle. Ainsi, un gramme de sub-

stance cérébrale des hémisphères neutralise une dose 40 fois mortelle de poison tétanique.

Le pouvoir antitoxique de la substance cérébrale de la base du cerveau prise avec le cervelet, ainsi que celui du bulbe pris avec la partie supérieure de la moelle, est beaucoup plus faible.

Pour immuniser les cobayes contre le tétanos, nous leur injections d'abord le mélange de toxine et d'iode [1], puis de la toxine pure en commençant par une dose très faible (2 ou 3 fois moindre que la dose mortelle) pour leur éviter, autant que possible, les phénomènes tétaniques. Cette manière de faire nous a donné de bons résultats. Nous avons toujours perdu nos animaux, lorsque, suivant les conseils de quelques auteurs, nous injections de fortes doses de toxine pure, après des injections préalables de mélange de toxine et d'iode.

Nous avons également essayé d'immuniser les cobayes, mais sans aucun succès, en leur injectant un mélange de toxine et de substance cérébrale dans lequel nous augmentions petit à petit la dose de toxine.

Dans nos expériences nous avons mélangé la toxine tétanique avec de la substance cérébrale des cobayes

a) ayant reçu une seule injection de poison tétanique ;

b) dont l'immunisation datait de 1-2 mois, et

c) que nous avions immunisés depuis 3 à 4 mois.

PREMIÈRE SÉRIE D'EXPÉRIENCES

Expériences pratiquées avec de la substance nerveuse des animaux ayant reçu une seule injection de toxine tétanique.

EXPÉRIENCE I (de contrôle).

Injection de mélange de toxine et de cerveau normal.

1. Cobaye : 340 gr. ; injecté avec de la toxine seule [2]. Mort au bout de 2 jours.

1. ROUX et VAILLARD, *Annales de l'Inst. Pasteur*, 1893, n° 2.

2. La toxine tétanique qui a servi pour nos expériences a été préparée à l'Institut Pasteur. Elle a été le plus souvent extrêmement active, car 1/5000 de c. c. tue un cobaye de poids moyen en 6 à 7 jours, et 1/1000 de c. c. en 1 jour 1/2 à 2 jours. Comme nos expériences ont duré assez longtemps, j'ai été obligé d'employer des échantillons de toxine préparés à des dates différentes. Le pouvoir de la toxine ne pouvant pas être dans ces conditions toujours le même, nous avons injecté, dans chaque expérience, des cobayes témoins avec la même dose de toxine qui nous a servi pour le mélange avec de la substance cérébrale normale, ou bien avec de la substance cérébrale de cobaye immunisé.

2. Cob. : 400 gr. ; injecté avec le mélange de toxine et de $0^{gr},12$ de substance cérébrale (hémisphères). Mort au bout de 4 jours.

3. Cob. : 400 gr. ; injecté avec le mélange de toxine et de $0^{gr},375$ de bulbe. Mort au bout de 4 jours.

Dans les expériences II, III et IV, nous injections aux cobayes de la même toxine et à la même dose que dans l'expérience I.

Expérience II.

Le cerveau qui a servi à cette expérience provenait d'un cobaye auquel on a fait une seule injection de toxine, et qui a présenté des phénomènes morbides peu marqués. Le cerveau a été pris 15 jours après l'injection.

1. Cob. : 360 gr. Injecté avec le mélange de toxine et de $0^{gr},13$ de substance cérébrale (hémisphères). Mort au bout de 5 jours et 10 heures.

2. Cob. : 680 gr. ; toxine et $0^{gr},33$ de substance cérébrale. Mort au bout de 12 jours.

Expérience III.

Nous avons employé pour cette expérience le cerveau d'un cobaye ayant reçu une seule injection d'une forte dose de toxine tétanique. Le cerveau a été enlevé 20 jours après l'injection de toxine.

1. Cob. : 370 gr. ; injecté avec le mélange de toxine et de $0^{gr},13$ de substance cérébrale (hémisphères). Mort au bout de 5 jours.

2. Cob. : 350 gr. ; toxine et $0^{gr},17$ de substance cérébrale. Mort au bout de 4 jours 1/2.

Expérience IV.

Le cobaye dont le cerveau a servi pour cette expérience n'a reçu qu'une seule injection de toxine. Le cerveau a été enlevé 8 jours après cette injection.

1. Cob. : 360 gr. A reçu en injection de la toxine avec $0^{gr},14$ de substance cérébrale (hémisphères). Mort après 6 jours et 4 heures.

2. Cob. : 340 gr. ; toxine et $0^{gr},36$ de substance bulbaire. A vécu à peine 4 jours.

DEUXIÈME SÉRIE D'EXPÉRIENCES

Ces expériences ont été pratiquées avec de la substance cérébrale provenant des animaux dont l'immunisation a duré un à deux mois.

Expérience V.

Cerveau employé provenant d'un cobaye dont l'immunisation a duré un mois. Le cerveau a été enlevé 15 jours après la dernière injection de toxine.

1. Cob. : 350 gr. A reçu de la toxine seule. Mort au bout de 2 jours 1/2.

2. Cob. : 400 gr. ; toxine et $0^{gr},12$ de cerveau normal. Mort au bout de 7 jours.

3. Cob. : 400 gr. ; toxine et $0^{gr},12$ de cerveau d'un cobaye immunisé. Mort le 8e jour.

4. Cob. : 730 gr.; toxine et 0gr,16 de cerveau d'un cobaye immunisé. Mort le 9e jour.

5. Cob. : 300 gr.; toxine et 2 c. c. de sang immunisé. Mort le 4e jour.

EXPÉRIENCE VI.

Le cerveau employé provenait d'un cobaye immunisé pendant un mois. L'animal a été sacrifié 4 jours après la dernière injection de toxine.

1. Cob. : 460 gr. A reçu de la toxine seulement. Mort le 7e jour.

2. Cob. : 370 gr.; toxine et 0gr,04 de cerveau normal (hémisphères). N'a présenté que des phénomènes morbides peu marqués le 4e jour et a guéri.

3. Cob. : 360 gr.; toxine et 0gr,24 de la base du cerveau d'un cobaye normal. A guéri après avoir présenté des signes peu marqués du tétanos.

4. Cob. : 360 gr.; toxine et 0gr,06 de cerveau (hémisphères) de cobaye immunisé. A guéri après avoir présenté, le 6e jour, des phénomènes morbides.

5. Cob. : 260 gr.; toxine et 0gr,3 de la base du cerveau d'un cobaye immunisé. A guéri après avoir présenté des signes peu marqués du tétanos.

EXPÉRIENCE VII.

Le cerveau qui a servi pour cette expérience provient d'un cobaye qu'on a immunisé, pendant un mois et demi. L'animal a été sacrifié 9 jours après la dernière injection de toxine.

1. Cob. : 330 gr. A reçu de la toxine seule. Mort au bout de 6 jours.

2. Cob. : 300 gr.; toxine et 0gr,022 de cerveau normal (hémisphères). A guéri après avoir présenté, le 3e jour après l'injection, des phénomènes morbides.

3. Cob. : 300 gr.; toxine et 0gr,39 de substance bulbaire. A guéri après avoir présenté pendant 7 jours des phénomènes morbides peu marqués.

4. Cob. : 430 gr.; toxine et 0gr,029 de substance cérébrale (hémisphères) d'un cobaye immunisé. A guéri après avoir présenté des phénomènes morbides le 3e jour.

5. Cob. : 290 gr.; toxine et 0gr,33 de substance bulbaire d'un animal immunisé. A guéri après avoir traîné ses pattes pendant 16 jours.

6. Cobaye : 380 grammes de toxine et 2 c. c. de sang d'un cobaye immunisé. Mort au bout de 9 jours.

EXPÉRIENCE VIII.

Le cerveau qui a servi pour cette expérience provient d'un cobaye qu'on a immunisé pendant un mois et qu'on a sacrifié 8 jours après la dernière injection de toxine.

1. Cob. : 320 gr. A reçu seulement de la toxine. Est mort au bout de 6 jours 1/2.

2. Cob. : 300 gr.; toxine et de 0gr,04 d'hémisphères cérébraux d'un animal neuf. A rapidement guéri, après avoir présenté des signes peu marqués du tétanos le 5e jour.

3. Cob. : 250 gr.; toxine et 0gr,12 de substance cérébrale, provenant des hémisphères d'un cobaye neuf. Se porte bien.

4. Cob. : 340 gr.; toxine et 0gr,38 de substance bulbaire d'un animal neuf. A guéri après avoir présenté des phénomènes peu marqués du tétanos le 4e jour.

5. Cob. : 400 gr.; toxine et 0gr,04 de substance cérébrale des hémisphères de l'animal immunisé. Signes du tétanos le 4e jour, guérison.

6. Cob. : 290 gr.; toxine et 0gr,30 de substance bulbaire de l'animal immunisé. Guérison après quelques phénomènes tétaniques.

7. Cob. : 320 gr.; toxine et 1 c. c. de sang de l'animal immunisé. Mort au bout de 8 jours.

Expérience IX.

Le cerveau employé provenait d'un cobaye immunisé pendant un mois. L'animal a été sacrifié 7 jours après la dernière injection de toxine.

1. Cob. : 350 gr. A reçu de la toxine seule. Mort au bout de 2 jours 1/2.

2. Cob. : 330 gr.; toxine et 0gr,066 de substance cérébrale (hémisphères) de l'animal neuf. Phénomènes tétaniques le 3e jour, mort le 7e jour.

3. Cob. : 310 gr.; toxine et 0gr,066 de substance cérébrale (hémisphères) de l'animal immunisé. Phénomènes tétaniques le 3e jour, mort le 7e jour.

4. Cob. : 330 gr.; toxine et 0gr,066 de substance cérébrale (hémisphères) de l'animal immunisé. Mort le 11e jour.

5. Cob. : 300 gr.; toxine et 2 c. c. de sang. Mort au bout de 4 jours.

6. Cob. : 330 gr.; toxine et 0gr,4 de sang. Mort au bout de 2 jours.

Expérience X.

On a employé pour cette expérience le cerveau d'un animal qu'on avait immunisé pendant 1 mois 1/2.

1. Cob. : 470 gr.; toxine et 0gr,12 de matière cérébrale (hémisphères) d'un cobaye neuf. Mort le 10e jour.

2. Cob. : 330 gr; toxine et 0gr,3 de substance cérébrale (base du cerveau) d'un cobaye neuf. Mort au bout de 5 j. 1/2.

3. Cob. : 370 gr.; toxine et 0gr,35 de matière cérébrale (bases du cerveau), de l'animal immunisé. Mort au bout de 5 jours.

Expérience XI.

Le cerveau qui a servi pour cette expérience, provenait d'un cobaye auquel on a d'abord injecté un mélange de toxine et de matière cérébrale, puis une forte dose de toxine seule. A la suite de cette deuxième injection, l'animal a traîné une patte. Sacrifié 20 jours après la dernière injection.

1. Cob. : 400 gr. A reçu en injection de la toxine seule. Mort au bout de 2 jours.

2. Cob. : 350 gr.; toxine et 0gr,16 de matière cérébrale (hémisphères) d'un animal neuf. Mort au bout de 6 jours.

3. Cob. : 310 gr.; toxine et 0gr,25 de matière cérébrale (base du cerveau) d'un cobaye neuf. Mort au bout de 4 j. 1/2.

4. Cob. : 370 gr.; toxine et 0gr,16 de matière cérébrale (hémisphères) du cobaye immunisé. Phénomènes tétaniques le 3e jour, guérison.



5. Cob. : 290 gr.; toxine et matière cérébrale (hémisphères) du cobaye immunisé. Mort le 9e jour.

6. Cob. : 300 gr.; toxine et 0gr,32 de substance cérébrale (base du cerveau) du cobaye immunisé. Mort au bout de 5 jours.

Expérience XII.

On a employé le cerveau d'un cobaye, dont l'immunisation a duré deux mois et qu'on a sacrifié 3 jours après la dernière injection.

1. Cob. : 410 gr.; injection de toxine seule. Mort au bout de 1 j. 1/2.

2. Cob. : 150 gr. toxine et 0gr,12 de matière cérébrale (hémisphères de cobaye neuf. Mort au bout de 5 jours.

3. Cob. : 300 gr.; toxine et 0gr,12 de matière cérébrale (hémisphères) d'un cobaye immunisé. Mort au bout de 6 jours.

4. Cob. : 250 gr.; toxine et 0gr,16 de substance cérébrale (hémisphères) du cobaye immunisé. Mort au bout de 6 jours.

5. Cob. : 400 gr.; toxine et 0gr,40 de matière bulbaire de l'animal immunisé. Mort au bout de 4 jours.

Expérience XIII.

Le cerveau employé provenait d'un cobaye dont l'immunisation a duré deux mois environ.

1. Cob. : 350 gr. ; injection de toxine seule. Mort au bout de 5 jours.

2. Cob. : 340 gr. ; toxine et 0gr,08 de substance cérébrale (hémisphères) normale. Phénomènes morbides légers le 4e jour, guérison rapide.

3. Cob. : 360 gr.; toxine et 0gr,21 de substance cérébrale (base du cerveau). Phénomènes tétaniques marqués, guérison.

4. Cob. : 300 gr.; toxine et 0gr,06 de substance cérébrale (hémisphères) du cobaye immunisé. Phénomènes tétaniques nets, guérison rapide.

5. Cob. : 290 gr.; toxine et 0gr,26 de substance cérébrale (base du cerveau) du cobaye immunisé. Phénomènes tétaniques peu marqués.

6. Cob. : 500 gr.; toxine et 1 c. c. de sang du cobaye immunisé. Pas de phénomènes morbides.

7. Cob. : 370 gr. ; toxine et 0gr,03 de sang immunisé. Maladie légère, guérison.

Expérience XIV.

Le cerveau employé dans cette expérience provient d'un cobaye dont l'immunisation a duré deux mois. Il a été sacrifié 14 jours après la dernière injection de toxine.

1. Cob. : 380 gr.; injection de toxine seule. Mort au bout de 2 jours.

2. Cob. : 400 gr.; toxine et 0gr,12 de substance cérébrale (hémisphères) normale. Mort le 6e jour.

3. Cob. : 440 gr.; toxine et 0gr,03 d'émulsion cérébrale (base du cerveau) normale. Mort le 5e jour.

4. Cob. : 400 gr.; toxine et 0gr,36 d'émulsion de bulbe normal. Mort le 4e jour.

5. Cob. : 400 gr.; toxine et 0gr,12 de substance cérébrale du cobaye immunisé. Phénomènes morbides le 3e jour, mort au bout de 15 jours.

6. Cob. : 425 gr.; toxine et 0gr,17 de substance cérébrale du cobaye immunisé. Mort le 13e jour.

7. Cob. : 370 gr.; toxine et 0gr,455 d'émulsion de bulbe du cobaye immunisé. Mort au bout de 5 jours.

8. Cob. : 480 gr.; toxine et 0gr,38 de matière cérébrale (base du cerveau) de l'animal immunisé. Mort au bout de 6 jours.

9. Cob. : 450 gr.; toxine et 0gr,05 de sang du cobaye immunisé. Phénomènes morbides le 5e jour. Mort le 11e jour.

TROISIÈME SÉRIE D'EXPÉRIENCES

Dans cette série, on s'est servi du cerveau d'animaux dont l'immunisation a duré de 3 à 4 mois.

Expérience XV.

Le cobaye dont le cerveau a servi à cette expérience a été immunisé pendant 3 mois et sacrifié 7 jours après la dernière injection de toxine.

1. Cob. : 400 gr.; injection de toxine seule. Mort au bout de 3 j. 1/2.

2. Cob. : 300 gr.; toxine et 0gr,066 de matière cérébrale normale (hémisphères). Mort au bout de 9 jours.

3. Cob. : 320 gr.; toxine et 0gr,033 de substance cérébrale (hémisphères) de l'animal immunisé. Phénomènes tétaniques le 3e jour, guérison.

4. Cob. : 400 gr.; toxine et 0gr,066 de substance cérébrale (hémisphères) de l'animal immunisé. Phénomènes tétaniques le 5e jour, guérison.

5. Cob. : 560 gr.; toxine et 0gr,12 de substance cérébrale (hémisphères) de l'animal immunisé. Très bon état.

6. Cob. : 510 gr.; toxine et 0gr,06 de sang immunisé. Aucun phénomène.

7. Cob. : 460 gr.; toxine et 0gr,03 de sang de l'animal immunisé. Rien..

Expérience XVI.

On a employé le cerveau d'un cobaye qu'on avait immunisé pendant 3 mois et sacrifié 5 jours après la dernière injection de toxine.

1. Cob. : 300 gr.; injection de toxine seule. Mort au bout de 1 j. 1/2.

2. Cob. : 290 gr.; toxine et 0gr,066 de substance cérébrale (hémisphères) normale. Mort au bout de 5 jours.

3. Cob. : 290 gr.; toxine et 0gr,066 de substance cérébrale (hémisphères) de l'animal immunisé. Mort au bout de 9 jours.

4. Cob. : 395 gr.; toxine et 0gr,066 de substance cérébrale du cobaye immunisé. Phénomènes morbides le 4e jour, guérison.

5. Cob. : 280 gr.; toxine, 0gr,066 de substance cérébrale normale et 0gr,033 de foie normal. Mort au bout de 4 jours.

6. Cob. : 270 gr.; toxine, 0gr,066 de substance cérébrale normale, 0gr,033 de foie. Phénomènes morbides à peine marqués le 9e jour, guérison.

7. Cob. : 330 gr.; toxine et 0gr,033 de foie de l'animal immunisé. Rien.

8. Cob. : 470 gr.; toxine et 0gr,01 de sang du cobaye immunisé. Rien.

9. Cob. : 300 gr.; toxine et 1/80 de c. c. de sang du cobaye immunisé. Mort au bout de 5 jours.

Il est intéressant de remarquer que, dans cette dernière expérience, le cobaye injecté avec le mélange de toxine, d'émulsion cérébrale normale et de foie normal, est mort avant celui qui n'a reçu que de la toxine mélangée seulement avec de la substance cérébrale normale. De plus, le cobaye injecté avec le mélange de toxine et de foie du cobaye immunisé, n'a présenté aucun phénomène morbide, tandis que le cobaye auquel on avait injecté de la toxine mélangée à de la substance cérébrale normale et du foie du cobaye immunisé, a présenté des phénomènes tétaniques, bien que très peu marqués.

Expérience XVII.

Le cerveau employé dans cette expérience provient d'un cobaye qu'on avait immunisé pendant 4 mois et sacrifié 10 jours après la dernière injection.

1. Cob. : 370 gr.; injection de toxine seule. Mort au bout de 2 j. 1/2.

2. Cob. : 300 gr.; toxine et 0gr,066 de substance cérébrale (hémisphères) normale. Phénomènes tétaniques le 3e jour, mort le 6e jour.

3. Cob. : 260 gr.; toxine et 0gr,066 de substance cérébale (hémisphères) du cobaye immunisé. Phénomènes tétaniques le 4e jour. Mort au bout de 12 jours.

4. Cob. : 400 gr.; toxine et 0gr,033 de substance cérébrale (hémisphères) du cobaye immunisé. Guérison.

5. Cob. : 260 gr. toxine et 0gr,01 de sang du cobaye immunisé. Rien.

6. Cob. : 450 gr.; toxine et 1/20 de c. c. de sang du cobaye immunisé. Phénomènes morbides, guérison.

Expérience XVIII.

Le cerveau qui a servi pour cette expérience provient d'un cobaye qu'on avait immunisé pendant 4 m. 1/2 et qu'on a sacrifié 15 jours après la dernière injection de toxine.

1. Cob. : 360 gr.; injection de toxine seule. Mort au bout de 1 j. 1/2.

2. Cob, : 420 gr.; toxine et 0gr,10 de substance cérébrale (hémisphères) normale. Mort au bout de 6 j. 1/2.

3. Cob. : 400 gr.; toxine et 0gr,10 de substance cérébrale (hémisphères) du cobaye immunisé. Phénomènes morbides le 3e jour. Guérison rapide.

4. Cob. : 430 gr.; toxine et 0gr,10 de substance cérébrale (hémisphères) du cobaye immunisé. Phénomènes morbides le 6e jour, guérison.

5. Cob. : 460 gr.; toxine et 0gr,05 d'émulsion de bulbe du cobaye immunisé. Mort le 9e jour.

6. Cob. : 350 gr.; toxine et 0gr,04 d'émulsion de bulbe normal. Mort le 6e jour.

7. Cob. : 300 gr.; toxine et 0gr,03 de sang de l'animal immunisé. Pas le moindre phénomène morbide.

8. Cob. : 200 gr.; toxine et 1/80 de c. c. de sang du cobaye immunisé. Mort au bout de 6 jours.

Les conclusions que nous croyons pouvoir tirer de nos expériences tiennent dans les quelques propositions suivantes :

1° Le cerveau des animaux dont l'immunisation n'a été que de courte durée, et dont le sang ne possède pas un grand pouvoir antitétanique, ne diffère pas par sa « propriété antitétanique » du cerveau normal ;

2° Le cerveau des animaux que nous avons immunisés pendant longtemps, et dont le sang contient une grande quantité d'antitoxine, peut inactiver une plus grande quantité de poison tétanique que le cerveau des animaux normaux. Cette différence n'est cependant pas considérable, car tous les animaux injectés avec le mélange de poison et de cerveau, d'un cobaye immunisé ont présenté des phénomènes nettement tétaniques;

3° Le sang des animaux dont l'immunisation a été longue contient toujours plus d'antitoxine tétanique que leur cerveau.

Étant donné que le cerveau des animaux immunisés ne possède un grand « pouvoir antitétanique » que quand le sang de ces animaux est riche en antitoxine, étant donné aussi que le cerveau des animaux immunisés est le plus souvent hyperhémié, nous supposons que le cerveau des animaux immunisés est capable d'inactiver une quantité de poison tétanique d'autant plus grande qu'il contient plus de sang riche en antitoxine.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons fait l'expérience suivante (voir l'exp. XVI).

Nous avons injecté à un cobaye le mélange de toxine, de cerveau normal (0gr,066) et de foie normal (0gr,033) ; à un autre le mélange de toxine, de substance cérébrale normale (0gr,006) et de foie (0gr,033) d'un animal dont le sang possédait un grand pouvoir antitoxique. Un troisième cobaye a été injecté avec le mélange de toxine et de foie (0gr,033) du même animal immunisé. Le foie a été ajouté comme organe n'agissant pas *in vitro* sur la toxine tétanique, comme on sait.

Cette expérience a montré que le cobaye injecté avec un mélange de toxine, de cerveau normal et de 0gr,033 du foie d'un animal immunisé n'a présenté que des signes à peine marqués du tétanos, et encore ceux-ci n'ont apparu que le 9e jour ; tandis que les deux cobayes injectés avec le mélange de toxine et de cerveau d'un animal immunisé sont devenus malades, et l'un d'eux est mort le 9e jour (un cobaye témoin ayant reçu en injec-

tion le mélange de toxine et de cerveau normal est mort le 4e jour).

Nous avons exécuté en outre l'expérience suivante. Nous nous sommes servi des hémisphères d'un animal faiblement immunisé et de ceux d'un autre dont le sang était très riche en antitoxines. Nous avons préparé une émulsion de substance nerveuse des hémisphères de chacun de ces animaux, après avoir découpé ces centres nerveux en tout petits morceaux sur un verre de montre et après les avoir exprimés de façon à les débarrasser des parties liquides (sérum). Voici les résultats de cette expérience.

1. Cob. témoin : 380 gr. Injecté avec de la toxine seule. Mort le 4e jour.

2. Cob. témoin : 310 gr. Injecté avec le mélange de toxine et de 0gr,066 de cerveau normal. Mort au bout de 9 jours et 1 heure.

3. Cob. : 320 gr. Injecté avec le mélange de toxine et de 0gr,066 de cerveau d'un cobaye faiblement immunisé. Mort au bout de 8 jours et 20 heures.

4. Cob. : 310 gr. Injecté avec le mélange de toxine et de 0gr,066 de cerveau d'un cobaye fortement immunisé. Mort le 11e jour.

5. Cob. : 460 gr. Injecté avec le mélange de toxine et de 2 cent. 1/2 de sang d'un cobaye faiblement immunisé. A été bien malade, mais a guéri.

6. Cob. : 300 gr. Injecté avec le mélange de toxine et de 0gr,8 de sang d'un animal faiblement immunisé. Mort le 6e jour.

7. Cob. : 360 gr. Injecté avec le mélange de toxine et de 0gr,1 de sang d'un cobaye fortement immunisé. Se porte très bien.

8. Cob. : 350 gr. Injecté avec le mélange de toxine et de 1/80 de c. c. de sang d'un cobaye fortement immunisé. Est mort le 7e jour.

En comparant cette expérience avec toutes celles mentionnées plus haut, nous croyons pouvoir conclure d'une manière générale que le cerveau d'un animal immunisé ne possède pas un « pouvoir antitoxique » plus grand que le cerveau normal, étant donné qu'il ne devient pas plus riche en substances neutralisant la toxine tétanique.

Nous tenons à exprimer ici notre vive reconnaissance à M. le Professeur Metchnikoff, pour la bienveillance qu'il nous a témoignée pendant notre séjour dans son laboratoire.

Sceaux. — Imprimerie Charaire.

Le Gérant : G. Masson.



17me ANNÉE MARS 1903. N° 3

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

SUR LE MODE D'ACTION DES ANTITOXINES SUR LES TOXINES

Par le Dr J. BORDET

Directeur de l'Institut antirabique et bactériologique du Brabant, à Bruxelles.

La plupart des savants qui ont étudié les antitoxines admettent aujourd'hui que ces substances modifient le poison dont elles sont l'antidote. En d'autres termes, ce n'est guère en le rendant plus résistant que l'antitoxine protège l'organisme contre la toxine, c'est bien plus en réagissant sur cette dernière, c'est en annihilant, par une action directe, ses propriétés nocives.

Cette conclusion résulte de diverses recherches bien démonstratives, parmi lesquelles il faut citer notamment celles de MM. Martin et Cherry. Elle s'est imposée avec force le jour où il a été possible, grâce à M. Ehrlich, d'éliminer des expériences l'organisme vivant, ce réactif si incertain, et de le remplacer par des éléments cellulaires sensibles au poison. Dès lors, on pouvait étudier *in vitro* l'influence de l'antitoxine sur la toxine — l'élément sensible s'altérant lorsqu'on le mettait au contact de la toxine, demeurant au contraire intact lorsque celle-ci avait été au préalable neutralisée par une dose convenable de sérum antitoxique.

L'idée que l'antitoxine non seulement modifie la toxine, mais encore s'unit avec elle, est en parfaite harmonie avec les données relatives aux autres substances actives des sérums, et c'est pourquoi nous pouvons l'accepter avec une sécurité très suffisante. Tout se passe en effet, on le sait, comme si les agglutinines, les sensibilisatrices, l'alexine, se fixaient sur les microbes et les cellules qu'elles impressionnent; il en est de même des précipitines, dont l'analogie avec les agglutinines est frap-

pante, mais qui s'unissent à des subtances chimiques non organisées, et que ce caractère permet de rapprocher, dans une certaine mesure, des antitoxines proprement dites.

Ce fait, que l'antitoxine annule les dangereuses propriétés de la toxine grâce à une combinaison directe, pouvant être considéré comme acquis, il fallait tenter de préciser la réaction intime qui s'effectue entre ces deux substances. Certains savants ont consacré beaucoup d'efforts à la solution de ce problème. Forcément, cette solution devait être incomplète. La nature, la constitution moléculaire de ces substances étant fort mystérieuses, leur composition même demeurant inconnue, les réactions qui prennent cours entre elles ne pouvaient apparaître avec l'évidence, la clarté, l'élégante précision auxquelles les chimistes qui manient des corps bien définis nous ont habitués.

Il faut donc se borner, provisoirement, à esquisser les caractères généraux de cette réaction, à décrire l'allure qu'elle affecte, à rechercher les règles suivant lesquelles elle s'opère. La première question à résoudre est évidemment celle-ci : l'antitoxine s'unit-elle à la toxine en proportions strictement définies, et constantes, à la façon dont un acide monobasique s'unit à un alcali, auquel cas le produit de la neutralisation a une composition fixe et invariable : ou bien l'une de ces substances peut-elle se combiner à des doses variables de l'autre? Si cette seconde supposition est la vraie, on doit prévoir que les deux matières (toxine et antitoxine) pourront former, en s'unissant, non pas un composé toujours le même, et qui infailliblement apparaîtra avec ses caractères immuables, mais un produit dont la composition variera suivant les proportions relatives des deux substances réagissantes. En mélangeant par exemple volumes égaux de toxine et d'antitoxine, on obtiendra un corps différent de celui qui prendrait naissance si à un volume du premier liquide on ajoutait deux volumes du second. Suivant les doses respectives mises en jeu, on aura des composés divers ; tous seront constitués des mêmes éléments, toxine et antitoxine, mais se distingueront en ce que l'un de ces éléments y sera plus ou moins saturé par l'autre. Dans cette hypothèse, la réaction de la toxine et de l'antitoxine pourrait être rapprochée, tout au moins à ce point de vue de la variabilité des proportions, de celle de l'iode sur l'amidon. On le sait, l'amidon

peut absorber des quantités variables d'iode, et se teindre corrélativement en bleu plus ou moins foncé ; c'est pourquoi des chimistes autorisés ont rangé cette réaction dans la catégorie des phénomènes de teinture. Les corps qui se teignent peuvent fixer des quantités de couleur qui varient souvent dans de très larges limites.

Arrêtons-nous un instant à cette comparaison avec les phénomènes de teinture, que nous avons déjà invoquée antérieurement, — bien à tort sans doute, car elle a donné lieu, de la part des auteurs qui ont bien voulu lire nos mémoires précédents, à de véritables méprises.

Comme nous l'avons constaté autrefois[1], la quantité maximale de globules rouges qu'une dose déterminée de sérum hémolytique approprié peut détruire, varie beaucoup suivant la manière dont le sang est ajouté au sérum dissolvant. Si dans un certain volume (un c. c. par exemple) de sérum actif, on verse brusquement, en une seule fois, la quantité de sang dont on veut observer la destruction, cette quantité A pourra être relativement grande, et l'hémolyse sera néanmoins totale. Mais si l'on fractionne cette quantité A de sang en petites doses que l'on introduit l'une après l'autre, à des intervalles suffisamment espacés, dans un c. c. de sérum actif, on trouve que ce dernier ne détruit plus qu'un nombre d'hématies relativement faible (A/2 environ). Tout se passe alors comme si les premiers globules se chargeaient tellement des substances hémolytiques, qu'ils en dépouillent le liquide et n'en laissent plus pour les globules ajoutés ultérieurement.

Un globule peut donc absorber des doses variables de substances actives, la dose maximale qu'il peut fixer étant nettement supérieure à celle qui suffit à provoquer sa désagrégation[2]. Cette

1. Ces *Annales*, mai 1900.

2. On le sait, l'hémolyse résulte de la collaboration de l'alexine et de la sensibilisatrice. A laquelle de ces deux substances doit-on attribuer le résultat obtenu dans cette expérience? En d'autres termes, laquelle jouit de la propriété d'être absorbée en doses variables par le globule rouge? On trouve que ce caractère appartient aux deux substances. Mais c'est surtout l'alexine qui le présente avec le plus d'évidence et de netteté; c'est à elle que revient, en conséquence, la plus grande part dans le phénomène. Dans un tube contenant 5/10 de c. c. d'alexine (sérum frais de cobaye neuf), introduisons 3/10 de c. c. de sang défibriné (soigneusement lavé) de lapin, et, immédiatement après, 9/10 de c.c. de sensibilisatrice (sérum, chauffé à 55°, de cobaye immunisé contre le sang de lapin); l'hémolyse s'opère rapidement. 3 heures plus tard, ajoutons encore 1/10 de c. c. de sang et 3/10 de c. c. de sensibilisatrice, et enfin, après un nouvel intervalle d'une heure, 1/10 de sang et

remarque nous permettait d'émettre (à titre de simple hypothèse, car l'expérience ci-dessus rappelée n'était que préliminaire et ne pouvait autoriser une conclusion sûre et définitive) l'idée que l'absorption des principes actifs du sérum par la substance fixatrice des globules n'obéit pas à la loi des proportions constantes, et se rapproche plutôt de l'absorption des matières colorantes par les objets colorables, ceux-ci pouvant fixer des quantités plus ou moins grandes de ces matières. On pouvait, en conséquence, prévoir que l'énergie de l'absorption devait dépendre, dans une assez large mesure, des conditions de l'expérience (concentration des éléments réagissants, durée du contact, établissement d'un équilibre entre la dose de substance active absorbée et celle restant libre, etc.), et nous avons tenté, ultérieurement, d'affermir cette notion.

Ajoutons que cette interprétation a attiré l'attention de divers observateurs, lesquels ont réalisé des expériences analogues à celle que nous venons de rappeler; ils ont obtenu des résultats similaires, qui même sont plus démonstratifs, car ils sont mieux à l'abri des objections auxquelles notre expérience pouvait donner prise. Aussi considérons-nous comme fort instructives, à ce point de vue, les recherches de MM. Eisenberg et Volk [1], à qui l'on doit des renseignements précis sur la réaction des agglutinines avec les microbes, et qui ont institué, à ce sujet, beaucoup d'expériences nouvelles et importantes. Ils ont vu que la loi des proportions définies ne régit pas l'union de l'agglutinine avec la matière microbienne agglutinable. Ils ont constaté, au cours de leur travail, qu'un sérum agglutinant auquel on ajoute une dose A d'émulsion microbienne, soit en une seule fois, soit par fractions successives, se comporte comme le faisait le sérum hémolytique dans l'expérience ci-dessus mentionnée : il

3/10 de sensibilisatrice. Les globules introduits les derniers restent définitivement intacts. Préparons maintenant un mélange composé des mêmes éléments en mêmes proportions (5/10 d'alexine, 5/10 de sang, 15/10 de sensibilisatrice), mais où ces éléments sont mêlés en une seule fois. L'hémolyse s'effectue bientôt complètement. Dans le premier mélange, les globules intacts sont fortement sensibilisés, mais l'alexine leur manque, car cette matière a été accaparée par les hématies introduites en premier lieu. En effet, l'addition d'un peu d'alexine les détruit. Il faut conclure, donc, que les stromas des premiers globules (hémolysés) sont fortement chargés d'alexine et ne cèdent nullement cette substance à de nouvelles hématies, pourtant bien sensibilisées. Le composé stroma-alexine est stable et ne se dissocie pas. Nous reviendrons sur ce point, à propos d'une expérience de M. Morgenroth.

1. *Zeitschrift für Hygiene und Infektions Kranheiten*, t. XL, 1902.

agglutine moins de microbes lorsque ceux-ci sont introduits peu à peu. Les microbes peuvent absorber beaucoup plus d'agglutinine qu'il ne leur en faut pour être agglomérés. Dès que la quantité d'agglutinine est un peu notable, il s'établit un équilibre entre la dose qui reste libre et celle absorbée par les microbes, ceux-ci pouvant se saturer davantage si l'agglutinine est plus concentrée. Nous ne pouvons reproduire ici les conclusions si intéressantes de ces savants (variations du coefficient d'absorption suivant la dose d'agglutinine, rôle de la concentration relative de l'agglutinine et de la matière agglutinable, etc.); le fait le plus important, c'est que la matière agglutinable absorbe des quantités d'agglutinine qui varient chaque fois qu'on change les proportions relatives des deux substances réagissantes.

Il était donc assez légitime, semble-t-il, de présumer que la règle des proportions fixes pourrait ne pas s'appliquer strictement à ces phénomènes d'absorption, par les cellules ou les microbes, des principes actifs du sérum. Ici, ces proportions ont bien l'air d'être sinon quelconques, au moins fort élastiques, subordonnées qu'elles sont aux conditions de l'expérience, variables par conséquent comme le sont ces dernières. Nous sommes loin de la chimie ordinaire, de la chimie à équations et à équivalents! Au reste, c'était *uniquement pour exprimer cette idée* d'une manière plus frappante, que nous avons eu recours à la *comparaison* avec les phénomènes de teinture. Or, divers savants, discutant le rapprochement, ont supposé que nous méconnaissions entièrement le « caractère chimique » de la combinaison qui unit les substances actives du sérum à la matière fixatrice propre au globule. En d'autres termes, ils nous attribuent l'opinion que cette fixation dépend de causes purement mécaniques (adhésion superficielle, etc.), à l'exclusion de toute affinité élective et spécifique [1].

Il semble presque, à la lecture de ces savants, que, d'après nous, les globules absorberaient les matières actives des immunsérums appropriés, sans affinité spéciale, avec indifférence,

1. Faisons-le remarquer en passant, il nous paraît bien hasardé d'affirmer, comme ces auteurs semblent le faire, que les phénomènes de teinture ne devront jamais, à aucun titre, se ranger dans le cadre de la chimie, c'est-à-dire que les corps colorables n'absorbent les couleurs que mécaniquement, grâce à leurs propriétés physiques (texture, porosité) et jamais en raison de leur composition chimique et des affinités spéciales qui dépendent de cette composition.



comme le charbon accumule en lui, sans prédilection spécifique, les gaz les plus différents! Nous ne nous sommes pas prononcé sur l'intimité de la réaction, mais sur l'allure qu'elle affecte. Les termes « causes purement mécaniques », « adhésion superficielle » ne se trouvent pas dans notre travail. Nous n'abordons pas davantage la question de savoir si les phénomènes de teinture doivent être qualifiés de « physiques » ou de « chimiques ». Ce qui nous importe, c'est que ces réactions diffèrent de celles de la chimie ordinaire en ce qu'elles ne sauraient se traduire en équations ; les proportions suivant lesquelles les matières s'unissent varient trop suivant les conditions de l'expérience. C'est ce point de vue seul de la variabilité des proportions qui a motivé notre comparaison, et qui, d'après nous, la justifie. Les résultats de MM. Eisenberg et Volk, plaidant dans le même sens que les nôtres, viennent encore la rendre plus légitime. Mais que, dans le cas des sérums et des éléments sensibles, de véritables affinités entrent en jeu, le fait semble évident en raison du principe de la spécificité (sur lequel nous avons tant insisté nous-même) et personne ne le met en doute. Il est certain que ces éléments manifestent une avidité vraiment spécifique, exclusive même, pour les anticorps appropriés. Mais ce n'est pas, répétons-le, une raison pour qu'ils absorbent ceux-ci en proportions immuables, ni pour que le produit naissant de cette union affecte une composition fixe et toujours identique.

Cette digression terminée, revenons aux toxines et aux antitoxines, et reprenons la question posée plus haut. La combinaison de ces éléments se fait-elle en proportions fixes et constantes, le produit de la combinaison étant unique et invariable, ou bien ces proportions peuvent-elles varier entre des extrêmes assez éloignés, les composés qui apparaissent pouvant être divers suivant les conditions de l'expérience, et renfermer, pour une même dose d'un des éléments, des quantités variables de l'autre?

Avant de chercher une réponse, il est nécessaire de rappeler divers faits consignés par les expérimentateurs. On a constaté, tout d'abord, que, s'il faut une quantité A d'antitoxine pour neutraliser complètement et exactement une quantité T de toxine, il faudra 2 A, 3 A... *n* A pour neutraliser de la même façon 2 T,

3 T... *n* T. Pour ceux qui comme nous admettent que l'antitoxine agit directement sur la toxine et se combine avec elle, ce fait n'a rien d'inattendu. Au contraire, il est si naturel qu'on doit le considérer comme évident *a priori*. Mais il ne saurait, cela va de soi, nous apporter aucun renseignement sur le point de savoir si l'antitoxine et la toxine se combinent par équivalents bien définis et constants[1].

Un second fait, sur lequel M. Ehrlich a attiré l'attention, présente une grande importance. La dose minimum mortelle d'une toxine étant au préalable exactement déterminée, supposons qu'il soit nécessaire d'ajouter à 100 doses mortelles de cette toxine une quantité A de sérum antitoxique, pour obtenir une mixture dont la toxicité soit complètement abolie. Nous admettons, bien entendu, que la dose A d'antitoxine est juste suffisante à produire la neutralisation ; en d'autres termes, le liquide est inactif, mais ne contient pas d'antitoxine en excès. Préparons maintenant un liquide contenant encore A d'antitoxine, mais renfermant cette fois 101 doses mortelles de toxine. On doit prévoir que cette mixture tuera l'animal auquel on l'injecte, car il contient un excès de toxine égal à une dose mortelle. Or, il n'en est rien ; l'animal n'éprouve que des troubles très légers.

On peut même préparer des mélanges renfermant, pour A d'antitoxine, une quantité de toxine très notablement supérieure (pouvant aller parfois jusqu'à 200 doses mortelles environ) sans que la mixture obtenue tue les animaux, au moins dans le délai normal. L'injection ne provoque que des œdèmes faibles si l'excès de toxine est minime, plus graves si cet excès est notable.

Tel est le « phénomène d'Ehrlich ». On peut dire qu'il constitue une infraction évidente à la loi des proportions fixes. L'explication la plus simple du phénomène est, certes, celle que nous faisions prévoir plus haut et d'après laquelle les substances

1. Il serait superflu d'insister, si un bactériologiste n'avait pas affirmé récemment, dans le même ordre d'idées, que l'agglutinine se combine en proportions définies avec la matière agglutinable des microbes, en se fondant sur ce fait (aussi évident que possible *a priori*) que, s'il faut une dose A de sérum actif pour agglutiner bien nettement une dose B d'émulsion microbienne, il faut une dose 2 A pour produire le même effet dans une dose 2 B d'émulsion ! A ce compte-là, il faut admettre aussi qu'une couleur se combine en proportions définies à la surface d'un mur, puisque s'il faut A de couleur pour peindre ce mur de 10mq, il en faudra 2 A pour donner la même teinte à un mur de 20mq.

antagonistes (toxine et antitoxine) pourraient se combiner en proportions variables. On peut supposer que chaque molécule de toxine est capable de s'adjoindre, de fixer, un nombre variable de molécules du contrepoison. Admettons, par exemple, qu'une molécule T de toxine puisse s'unir soit à une seule, soit à 2, 3, 4, 5 molécules A d'antitoxine. Cinq composés sont donc possibles. Appelons-les TA^1, TA^2, TA^3, TA^4, TA^5; on comprend qu'ils seront d'autant moins toxiques qu'ils sont plus riches en antitoxine. Le premier TA^1 sera assez vénéneux, tout en l'étant moins que la toxine pure; les suivants, TA^2, TA^3, seront progressivement moins toxiques; TA^4, TA^5, qui renferment chacun une molécule toxique et 4 ou 5 molécules antitoxiques, seront (nous pouvons le supposer) dénués de toute activité; leur pouvoir nocif sera complètement aboli.

Si nous mélangeons à un volume de toxine renfermant 100 molécules T, un volume d'antitoxine contenant 200 molécules A, c'est le composé TA^2 qui se formera. L'antitoxine se distribuera donc également entre toutes les molécules présentes pour former un composé dont la toxicité, bien que médiocre, n'est pas nulle. Ce composé représente la molécule toxique partiellement saturée de molécules antitoxiques. C'est de la toxine qui n'est pas neutralisée, mais qui est atténuée.

Si, au même nombre de molécules de toxine (100 T), nous ajoutons cette fois 300 molécules d'antitoxine, c'est le composé TA^3 qui apparaitra, et ainsi de suite. Toujours, et quelles que soient les doses, l'antitoxine se *répartira également* sur toutes les molécules toxiques. Suivant les proportions respectives, on obtiendra donc des composés différents. Mais un mélange déterminé ne contiendra qu'un seul composé, formé de toxine dont l'avidité pour l'antitoxine sera plus ou moins satisfaite. Il en résulte qu'on ne *trouvera point*, dans de semblables mixtures, *de la toxine tout à fait libre et intacte* à côté de toxine complètement saturée par l'antitoxine.

Au contraire, si la toxine et l'antitoxine s'unissaient régulièrement suivant un rapport fixe, constant, unique, on obtiendrait très facilement une mixture contenant à la fois de la toxine parfaitement intacte, nullement combinée, et de la toxine saturée : il suffirait d'ajouter à un certain volume de toxine une quantité relativement faible d'antitoxine.

En résumé, suivant qu'on adopte l'hypothèse de la combinaison en proportions immuables, ou celle de l'union d'après des rapports variables, on sera conduit à attribuer à un pareil mélange [1] (formé de toxine et d'une dose insuffiante de contre-poison) deux compositions bien distinctes. Dans le premier cas, on admettra que le liquide renferme deux substances (toxine libre et active, toxine saturée et inoffensive). Si l'on se rallie à la seconde supposition, on dira que la mixture ne contient qu'une matière (toxine incomplètement saturée, non neutralisée, mais simplement atténuée).

Mais on conçoit immédiatement qu'une non-identité dans la composition *peut entraîner une différence marquée dans le mode d'action* du mélange sur l'organisme de la cellule sensible. Suivant l'idée qu'on se fera du mode d'union des deux substances antagonistes, on sera naturellement amené à prévoir aussi, pour le même liquide, des pouvoirs nocifs très dissemblables. On peut très bien concevoir qu'un liquide contenant uniquement de la toxine atténuée puisse être moins dangereux que celui où l'on trouve, à côté de toxine neutralisée, une certaine dose de toxine intacte. Le phénomène d'Ehrlich paraît dès lors fort explicable, si l'on accepte l'idée de la combinaison en proportions variables.

Ce qui précède est évidemment schématique, et le défaut des schémas et en général d'être trop précis. Le nôtre n'échappe pas à ce reproche, est il serait déraisonnable de le prendre trop à la lettre. Par exemple, il semble impliquer que l'union de la toxine et de l'antitoxine se fait par simple soudure moléculaire; il implique aussi, nécessairement, que la combinaison de nos deux substances obéit strictement à la loi des proportions multiples (la dose d'antitoxine fixée dans TA^3, par exemple, étant exactement multiple de celle fixée dans TA). On arrive à cette conséquence dès que, pour faciliter l'exposé, on figure chacune des substances en jeu sous forme d'*une* particule élémentaire, d'*une* molécule, laquelle est par définition indivisible. On comprend que notre but n'est pas de rechercher si la toxine et l'antitoxine

1. Faisons-le remarquer immédiatement, ce sont précisément de pareils mélanges (non mortels) que l'on prépare lorsqu'on réalise l'expérience d'Ehrlich, c'est-à-dire lorsqu'on ajoute à une dose A d'antitoxine capable de neutraliser complètement 100 doses mortelles, une quantité de toxine un peu trop forte (120 doses mortelles par exemple).



s'unissent en soudant simplement leurs molécules ou en échangeant des atomes, ni de savoir s'il s'agit ici de combinaisons en proportions exactement multiples ou simplement variables. De tels problèmes sont hors de portée actuellement, et l'expérience serait impuissante à les résoudre.

Une seule notion nous importe, et le schéma nous a servi à l'énoncer plus commodément. Si l'hypothèse de l'union en proportions variables est exacte, les caractères essentiels de la réaction sont les suivants :

1° Lorsqu'à un certain volume de toxine on mélange une quantité d'antitoxine qui ne suffit pas à produire une neutralisation complète, les molécules d'antitoxine ne sont pas accaparées par quelques molécules de toxine, celles-ci satisfaisant entièrement leurs affinités, — les autres unités toxiques restant intactes. Bien au contraire, les molécules d'antitoxine se partagent, se répartissent également sur toutes les molécules toxiques présentes, qui toutes, dès lors, sont partiellement saturées et perdent corrélativement, dans une certaine mesure, leur toxicité première. On peut dire qu'il y a atténuation de la toxine, puisqu'il y a formation, à ses dépens, d'un complexe moins vénéneux ;

2° Les phénomènes d'empoisonnement provoqués par ce complexe injecté à des animaux (ou mis en contact avec des cellules sensibles) pourront n'être pas identiques à ceux que produirait un mélange de toxine neutralisée et de toxine intacte ;

3° Entre ces deux termes extrêmes, toxine libre, toxine entièrement saturée et devenue inoffensive, on peut concevoir toutes les transitions (stades d'atténuation progressive). Chaque fois qu'on mélangera la toxine et l'antitoxine suivant le même rapport, on obtiendra le même degré d'atténuation.

On le sait, M. Ehrlich interprète le phénomène qu'il a découvert d'une manière tout à fait différente. Il admet que l'antitoxine et la toxine se combinent suivant un rapport invariable. Pour expliquer l'accroc que son phénomène fait subir à cette loi des équivalents fixes, M. Ehrlich suppose que la composition d'un bouillon toxique est fort complexe : on y trouve plusieurs poisons. L'un, très actif, c'est la toxine proprement dite. Un autre, moins dangereux, est la toxone.

La molécule de toxine, et celle de toxone, absorbent des quantités égales d'antitoxine. A ce point de vue, les deux sub-

stances se valent. Mais la toxine est supérieure à la toxone en ce qui concerne l'énergie de l'affinité; en effet, la toxine est plus avide d'antitoxine que ne l'est la toxone. Pour rendre un bouillon toxique absolument inoffensif, il faut y introduire une dose d'antitoxine capable de neutraliser complètement et la toxine et la toxone. Mais si un semblable mélange est additionné d'une quantité supplémentaire de bouillon toxique, la nouvelle toxine, ajoutée de la sorte, s'emparera de l'antitoxine précédemment combinée à la toxone; celle-ci est déplacée, elle est remise en liberté. En d'autres termes, si dans de l'antitoxine on met quelques doses mortelles (pas trop nombreuses!) de toxine en plus qu'il n'en faudrait pour avoir un mélange exactement neutre, on obtient un liquide qui ne renferme pas de toxine libre ; on y trouve, il est vrai, de la toxone non combinée, mais celle-ci étant relativement peu dangereuse, l'injection à l'animal est tolérée.

En réalité, l'exposé qui précède est fort simplifié, car M. Ehrlich a dû, pour que la théorie fût entièrement conforme à l'expérience, attribuer au bouillon toxique une composition vraiment fort compliquée. L'explication est incontestablement ingénieuse, mais l'existence de certaines matières intervenant dans le phénomène (et notamment des toxones) est hypothétique La question reste donc ouverte.



MODE D'ACTION DE L'ANTIALEXINE SUR L'ALEXINE

Nous aurions pu énoncer, il y a longtemps déjà, les considérations, bien élémentaires du reste, qui précèdent. En effet, elles nous ont été suggérées par des expériences faites en 1900 à l'Institut Pasteur (service de M. le Prof. Metchnikoff), et relatives à la neutralisation de l'alexine par l'antialexine. Mais il nous paraissait utile de compléter ces résultats déjà anciens en étudiant encore d'autres toxines et d'autres antitoxines. Nous n'avons pu jusqu'ici réaliser ce projet. Nous nous bornerons donc à consigner ici les faits que nous avons recueillis autrefois — quitte à revenir ultérieurement sur le sujet.

Considérons donc l'influence exercée sur l'alexine contenue dans du sérum frais d'animal d'espèce A, par l'anti-alexine appropriée, c'est-à-dire par le sérum (chauffé au préalable à 55°-56°)

d'un animal d'espèce B, antérieurement traité par 2 ou 3 injections de sérum frais d'espèce A[1].

Ces deux sérums antagonistes étant mélangés, il nous faut un réactif capable de déceler si l'alexine est encore active ou est annihilée. Nous employons à cet effet des globules rouges bien sensibilisés par un sérum hémolytique spécifique, chauffé au préalable à 55°. On le sait, ces éléments resteront intacts si l'alexine est complètement neutralisée.

L'expérience comporte naturellement un mélange de contrôle. Ce témoin a la même composition que le mélange précédent, sauf que le sérum antitoxique est remplacé par du sérum (également chauffé à 55°) provenant d'un animal neuf d'espèce identique à celle qui a fourni l'antialexine.

On le devine, nos premières expériences auront pour but de rechercher si nos sérums antagonistes présentent, en réagissant l'un sur l'autre, le « phénomène d'Ehrlich », phénomène si difficile à concilier avec l'hypothèse de la neutralisation suivant des proportions fixes.

Pour éviter, dans ces expériences et dans celles qui suivront, l'ingérence de graves causes d'erreur, il faut recourir à certaines précautions. Il faut avant tout, ne faire intervenir qu'une seule influence antitoxique, celle que l'on étudie et qui s'exerce sur l'alexine. Comme on met en jeu des globules sensibilisés, il faut donc que le sérum antialexique n'affaiblisse pas la sensibilisatrice employée pour impressionner ces globules. Il faut aussi que les sérums neufs, chauffés à 55°, qui servent de témoins à l'anti-alexine et à la sensibilisatrice, ne possèdent aucune propriété spéciale et puissent être considérés comme des liquides inertes. Bien entendu, il faut toujours contrôler l'inactivité absolue, au point de vue hémolytique, des sérums qui ont été chauffés à 55°. En outre le réactif employé (globules rouges sensibilisés) ne doit être introduit dans les mélanges qu'en doses très minimes; cette condition doit être remplie, si l'on veut déceler des quantités d'alexine très petites, et qui ne pourraient détruire beaucoup de globules.

1. On le sait, pour étudier les propriétés d'un sérum antialexique, il est nécessaire de le chauffer au préalable à 55°. On supprime ainsi l'alexine propre à ce sérum. En effet la seule alexine intervenant dans l'expérience doit être telle qu'on introduit sous forme de sérum frais d'animal neuf, et vis-à-vis de laquelle le sérum antialexique exerce une influence neutralisante. (Voir notre article sur les antitoxines des sérums hémolytiques. Ces *Annales*, mai 1900.)

Pour réaliser ces diverses conditions, nous employons les éléments suivants. Comme alexine, on se sert de sérum de cobaye neuf, récemment obtenu. L'antialexine est du sérum (préalablement chauffé à 55°-56° pendant une 1/2-heure) de lapin qui a reçu deux ou trois injections de sérum frais de cobaye. On emploie des globules de poule (lavés au préalable à la solution physiologique de NaCl), sensibilisés par du sérum (préalablement chauffé à 55°-56°) de lapin immunisé contre les globules de poule. Comme sérum témoin de l'anti-alexine et de la sensibilisatrice, on a recours à du sérum (également chauffé à 55°-56°) de lapin neuf.

En résumé, la toxine (alexine) provient du cobaye. Les autres sérums employés (antitoxine, sensibilisatrice et témoin) proviennent tous du lapin et n'exercent les uns sur les autres aucune influence. L'expérience ne peut donc être troublée par l'intervention de réactions accessoires.

Bornons-nous tout d'abord à mettre en évidence l'énergie de l'action anti-alexique. On prépare dans des tubes les mélanges suivants :

a) Ce tube contient : 2/10 de c. c. d'alexine ; 3/10 de c. c. d'antialexine ;

b) 2/10 de c. c. d'alexine ; 3/10 de c. c. de sérum non anti-alexique (sérum, chauffé à 55°, de lapin neuf.)

Une heure ou deux plus tard, on ajoute aux deux mélanges 2/10, de c. c. de sensibilisatrice (sérum, chauffé à 55°, de lapin immunisé contre le sang de poule). On introduit ensuite, dans chacun des tubes, une goutte de sang de poule (lavé à la solution physiologique). On constate que les globules s'hémolysent en 20 minutes dans le tube *b*; l'influence alexique est supprimée dans le tube *a*; les globules y sont encore parfaitement intacts le lendemain.

Il est facile de prouver que cette absence d'hémolyse est due uniquement à la neutralisation de l'alexine. La sensibilisatrice (dont la dose est d'ailleurs fort considérable relativement à celle des globules) n'est nullement atteinte [1].

1. Pour s'en convaincre, il suffit de remplacer l'alexine de cobaye (sensible à l'anti-alexine) par une alexine d'animal différent (lapin par exemple) sur laquelle l'anti-alexine n'a pas d'action. Préparons ainsi :

a) Ce mélange renferme 1/10 de c. c. de sensibilisatrice ; 2 c. c. d'anti-alexine ; c. c. de sérum frais de lapin neuf (alexine).

Tentons maintenant de mesurer la puissance de l'antialexine. Dans ce but, nous introduirons des doses variables d'alexine (comprises par exemple entre 1/20 de c. c. et 1 c. c., 2) dans une quantité constante (3/10 de c. c.), soit d'antialexine, soit de sérum non anti-alexique (sérum chauffé à 55° de lapin neuf). On a ainsi :

A) Tubes renfermant 3/10 de c. c. d'antialexine :

a renferme 1/20 de c. c. d'alexine; *b* en contient 1/10; *c*, 2/10; *d*, 3/10; *e*, 4/10; *f*, 5/10; *g*, 6/10; *h*, 7/10; *i*, 8/10; *j*, 9/10; *k*, 12/10, de c. c. d'alexine.

B) Série de tubes identiques aux précédents, sauf qu'ils renferment, au lieu d'antialexine, 3/10 de c. c. de sérum non antialexique.

On ajoute ensuite, à chacun des tubes de ces deux séries, 2/10 de c. c. de sensibilisatrice; enfin, une heure plus tard, on y introduit une goutte d'émulsion de globules de poule dans la solution physiologique de NaCl, — Les mélanges sont gardés à la température du laboratoire (18° environ).

Dans la série des tubes qui ne contiennent pas d'antialexine, l'hémolyse complète s'effectue rapidement, en un quart d'heure environ, dans les mélanges les plus riches en alexine, en une demi-heure dans le mélange le plus pauvre, c'est-à-dire dans celui qui contient 1/20 de c. c. d'alexine, 2/10 de sensibilisatrice, 3/10 de sérum non antialexique. En conséquence, 1/20 de c. c. d'alexine représente la dose minima mortelle en une demi-heure, et nous la choisirons comme unité. Remarquons immédiatement que la dilution à laquelle cette faible dose est soumise

b) Même composition que *a*, sauf que l'anti-alexine est remplacée par 2 c. c. de sérum de lapin neuf (chauffé à 55°).

c) 2 c. c. d'alexine de lapin; 2 c. c. de sérum de lapin neuf (chauffé à 55°). Ce mélange est donc constitué comme *b*, sauf que la sensibilisatrice est absente.

Aux trois mélanges on ajoute 1 goutte de globules de poule. L'hémolyse s'opère très rapidement, en quelques minutes, dans *a* et *b*. Elle n'est complète (bien que la dose d'alexine employée dans cette expérience soit considérable) qu'au bout de 3 heures dans le tube *c*, qui ne contient pas de sensibilisatrice. On voit donc que l'antialexine n'exerce aucune action sur un volume pourtant faible (20 fois moindre) de sensibilisatrice. On voit également que celle-ci agit avec beaucoup d'énergie, bien que la dose en soit assez minime, et qu'elle soit diluée dans un volume relativement très grand (4 c. c.) de liquide : l'influence affaiblissante de la dilution est tout à fait négligeable. Dans la suite du présent article, nous ne décrirons pas systématiquement de telles expériences, qui servent uniquement de contrôle, et dont le détail compliquerait trop l'exposé.

(un volume est dilué dans dix volumes de sérum chauffé) ne l'empêche pas d'agir avec énergie.

Considérons maintenant les mélanges renfermant de l'antialexine. Supposons tout d'abord que nous n'examinions les divers tubes qu'au bout d'un temps très long, le lendemain par exemple, laissant ainsi aux minimes traces d'alexine qui pourraient subsister à l'état libre dans certains mélanges, le temps d'opérer leur maximum d'action. On trouve, le lendemain, que l'hémolyse est complète dans les tubes renfermant 5/10 de c. c. d'alexine ou davantage; elle est très évidente, mais partielle, dans celui qui contient 4/10 de c. c. d'alexine; elle est très légère, à peine perceptible, dans celui qui en renferme 3/10. Les mélanges contenant 2/10 de c. c (ou moins encore) d'alexine ne présentent aucune diffusion d'hémoglobine.

On remarque que ces résultats plaident déjà quelque peu contre l'hypothèse de la combinaison en proportions bien définies. En effet, si le tube *d* présente une hémolyse très légère, c'est qu'il contient une trace, presque négligeable, il est vrai, d'alexine libre; le mélange suivant, *e*, qui renferme, en plus, deux doses d'alexine mortelles en une demi-heure, devrait présenter une hémolyse complète; or, celle-ci n'est que partielle. Le phénomène d'Ehrlich apparaît donc, mais il n'est pas, à la vérité, très accusé. Notons encore (en négligeant la très faible hémolyse du tube *d*) qu'il faut, pour que les globules soient définitivement protégés, employer un volume d'antialexine égal à celui de l'alexine.

Mais le résultat est bien plus intéressant si l'on observe les mélanges aussitôt après leur préparation, et si l'on note les moments auxquels l'hémolyse est devenue complete. Le phénomène d'Ehrlich apparaît alors d'une manière très frappante. En effet, le mélange contenant 12/10 de c. c. d'alexine et 3/10 de c. c. d'antialexine doit renfermer, conformément à ce qui précède (et d'après l'hypothèse de la neutralisation suivant un rapport fixe), 3/10 d'alexine neutralisée et 9/10 d'alexine intacte. Eh bien, l'hémolyse complète ne s'y observe qu'au bout de 70 minutes, délai au moins double de celui qu'exige l'hémolyse du mélange renfermant une seule dose mortelle d'alexine (1/20 de c. c.), sans antitoxine. Dans ce dernier, la destruction des globules est achevée, alors qu'elle n'a pas commencé dans l'autre.

Dans les mélanges renfermant l'antialexine et des doses d'alexine variant de 4/10 à 9/10 de c. c., les globules se détruisent. Mais l'hémolyse apparaît successivement dans chacun d'eux, et tarde d'autant plus que la dose d'alexine est moins forte. Ainsi, après 70 minutes, l'hémolyse, totale dans le tube renfermant 12/10 d'alexine, est nulle dans celui qui en contient 9/10 (tube *j*); elle ne s'y montre complète qu'au bout de 2 heures 1/2; à ce moment, elle est partielle dans le tube *i*, commence à peine dans le tube *h*,... et ainsi de suite. En un mot, le temps exigé pour la mise en liberté de l'hémoglobine est très régulièrement d'autant plus long qu'il y a moins d'alexine.

L'expérience montre donc qu'une quantité d'anti-alexine *incapable de neutraliser complètement plus de* 6 *doses mortelles* (en une 1/2 heure) d'alexine, exerce cependant une influence telle, qu'en sa présence, 24 *doses mortelles* déterminent l'hémolyse *moins rapidement que ne le fait une seule dose mortelle,* non impressionnée par le contrepoison.

On ne saurait admettre, en conséquence, que l'anti-alexine, ajoutée à une forte dose d'alexine, neutralise complètement une portion de cette substance sans toucher à l'excès : les mixtures obtenues ne se comportent nullement comme des dilutions d'alexine normale.

L'*antialexine se répartit sur la totalité de l'alexine présente*, conformément à la notion des proportions variables longuement développée plus haut. L'explication émise par M. Ehrlich à propos de la toxine diphtérique, et fondée sur l'existence de toxones, ne saurait être appliquée aux résultats que nous venons d'énoncer. Il suffit, pour s'en convaincre, de considérer notamment les proportions des sérums mis en jeu, le fait que la dose minimale d'alexine choisie (1/20 de c. c.) est déjà fortement hémolysante, et cette circonstance (si conforme à l'idée de la répartition de l'antialexine sur toute l'alexine présente) que le temps exigé pour l'apparition de l'hémolyse décroît régulièrement, par transitions ménagées et insensibles, au fur et à mesure que la dose d'alexine grandit.

Il faut conclure que, dans chacun de nos mélanges alexine-antialexine, il se forme un corps nouveau, un complexe formé des deux substances antagonistes (lesquelles n'existent plus à l'état libre), et dont la composition dépend de la proportion des deux

matières. Si l'on passe d'un mélange à un autre, le complexe change; il est plus ou moins toxique, car il représente de la toxine plus ou moins saturée d'antitoxine. L'anti-alexine atténue l'alexine; si la dose d'anti-alexine grandit, cette atténuation peut aller progressivement jusqu'à l'abolition complète du pouvoir toxique.

Il résulte de l'expérience qu'il est impossible de préparer un mélange d'alexine et d'antialexine qui soit exactement neutre, c'est-à dire qui soit dénué, à la fois, de pouvoir toxique et antitoxique. Bien entendu, cette notion n'est aucunement nouvelle; elle traduit simplement, en d'autres mots, le phénomène d'Ehrlich lui-même. Considérons un mélange renfermant, outre l'anti-alexine, une dose moyenne d'alexine (*f* ou *g* par exemple). Un tel mélange est toxique, car les globules finissent par s'y détruire. Il est antitoxique, car d'autres mélanges similaires, contenant autant d'anti-alexine, mais plus riches encore en alexine, n'hémolysent qu'avec un retard appréciable. Cette conséquence est, du reste, inséparable de l'idée de la combinaison en proportions variables, d'après laquelle on peut obtenir entre ces deux extrêmes, toxine active, toxine entièrement neutralisée, toute une série de stades d'atténuation progressive, le liquide considéré (*f* ou *g*) correspondant précisément à l'un de ces termes.

Pour démontrer que ce liquide possède, à côté d'une réelle toxicité, un pouvoir anti-alexique bien net, le raisonnement consiste, on le remarquera, à comparer ce mélange à d'autres mixtures similaires, mais un peu plus riches en alexine, et qui, pourtant, n'hémolysent que lentement. Mais on pourrait désirer une preuve plus directe. Préparons un de ces mélanges auxquels nous attribuons la propriété d'être à la fois toxique et antitoxique; par exemple, mélangeons à 3/10 de c. c. d'anti-alexine 5/10 de c. c. d'alexine active[1]. D'autre part, composons un liquide (mélange témoin inerte) formé de quantités correspondantes de sérum non anti-alexique (sérum chauffé de lapin neuf), et d'alexine rendue inactive par le chauffage à 55°. Deux ou trois heures plus tard, ajoutons aux deux mélanges un peu d'alexine active (1/10 de c. c.). On doit présumer que cette substance s'atténuera nettement dans le premier mélange. L'expérience confirme cette prévision,

1. Dans un tel mélange, les globules sensibilisés se détruisent après quelques heures.

mais pas d'une manière très frappante. Si, ultérieurement, nous ajoutons des globules de poule sensibilisés, ces hématies se détruisent en effet plus vite dans le second mélange (témoin) que dans le premier, mais la différence n'est pas considérable. Pourquoi ne l'est-elle pas?

Ce premier mélange renferme, outre l'anti-alexine, une quantité totale d'alexine égale à 6/10 de c. c. Mais celle-ci a été introduite en deux fractions successives. Il y a dès lors intérêt à comparer cette mixture, au point de vue de la puissance hémolytique, à celle, de composition identique, que l'on obtient en ajoutant en une seule fois les 6/10 de c. c. d'alexine aux 3/10 de c. c. d'anti-alexine.

Mélangeons donc, à 3/10 de c. c. d'anti-alexine, 5/10 d'alexine (liquide A) Trois heures plus tard, ajoutons encore 1/10 de c. c. d'alexine; en même temps, préparons un mélange B formé de 3/10 d'anti-alexine et de 6/10 d'alexine. Ajoutons aux deux liquides 2/10 de c. c. de sensibilisatrice active contre les globules de poule; attendons encore une heure environ, et introduisons enfin, dans chaque tube, deux gouttes de ces hématies. L'hémolyse exige une heure dans A, une heure trois quarts dans B. Un sérum anti-alexique affaiblit donc moins bien l'alexine, lorsque celle-ci, au lieu d'être ajoutée d'un coup, est introduite par doses fractionnées successives. Cette expérience correspond entièrement à celle que nous rappelions quelques pages plus haut, et dans laquelle des globules rouges sont ajoutés, soit en une, soit en plusieurs fois, à du sérum hémolytique.

Quand nous mélangeons de l'alexine à de l'antialexine, celle-ci se répartit uniformément sur la totalité de l'alexine; toutes les molécules toxiques sont également modifiées (formation d'un complexe); la composition du liquide est dès lors homogène. Mais, si, ultérieurement, nous introduisons encore de l'alexine, celle-ci tend à enlever de l'antitoxine au complexe déjà formé, tend, en d'autres termes, à troubler la répartition qui s'était établie. Par exemple, si le complexe primitif était TA, l'addition d'un T nouveau tend à donner 2 TA. Mais on conçoit que, TA^2 étant déjà constitué, les connexions entre l'alexine et l'anti-alexine étant établies sous cette forme, la réaction nouvelle (enlèvement d'anti-alexine au complexe) éprouve quelque difficulté à se produire, et qu'en conséquence, la dose

additionnelle d'alexine ne s'atténue pas aisément[1]. En d'autres termes, TA^2 ne se laisse pas arracher sans résistance une partie de son antitoxine. On conçoit encore que la difficulté avec laquelle cette réaction s'opère puisse être plus ou moins marquée suivant les toxines et les antitoxines que l'on considère[2]. Il est vraisemblable, en effet, que la stabilité du complexe (TA^2 par exemple) variera suivant les cas. Si le complexe est fort stable, un nouveau T, introduit ultérieurement, restera intact; il s'atténuera au contraire aisément, si le complexe perd facilement A.

On comprend que ces divers cas puissent se présenter, et cette manière de voir nous paraît nettement confirmée par une expérience récente de M. Morgenroth[3].

Ce savant sensibilise des globules rouges bien lavés, par un sérum hémolytique approprié, préalablement chauffé à 55°. Il centrifuge, décante le liquide surnageant, et enlève, par des lavages et centrifugations répétés, les traces du sérum actif. Il obtient ainsi des hématies chargées de sensibilisatrice, baignant dans un liquide où l'on ne peut plus déceler cette substance. A ces hématies, il ajoute une certaine quantité de globules de même espèce, mais normaux, non sensibilisés. Si, immédiatement après, on ajoute de l'alexine (en quantité qui, semble-t-il, ne doit pas être trop forte), celle-ci ne détruit qu'une partie des globules; elle atteint ceux qui sont sensibilisés et respecte les hématies normales. Mais, si cette addition d'alexine n'est effectuée qu'au bout d'un temps assez long, l'hémolyse affecte indistinctement tous les globules présents. M. Morgenroth conclut avec raison que les globules normaux, au bout d'un certain temps, ont pu enlever une certaine dose de sensibilisatrice à ceux qui en étaient chargés[4]. Il s'est fait, en d'autres termes, une modification dans la répartition de la sensibilisatrice, de même que, dans l'expérience précédente, il s'opérait un changement dans la distribution de l'anti-alexine.

1. Au contraire, si la totalité de l'alexine avait été mêlée, en une seule fois, à l'anti-alexine, le complexe TA se serait formé tout naturellement.

2. Et aussi, pour une même toxine et une même antitoxine, suivant que le complexe est plus ou moins saturé. Il est probable, en effet, qu'un complexe TA^4 se laisserait enlever de l'antitoxine plus aisément que ne le ferait TA^2.

3. *Münchener med. Wochenschrift*, 1903, n° 2.

4. Comme le dit M. Morgenroth, il est bien vraisemblable que, lors du passage de la sensibilisatrice d'une hématie à une autre, le liquide sert d'intermédiaire.

On le voit, le complexe qui naît de l'union de la sensibilisatrice avec la matière fixatrice du globule (et que nous pouvons, pour abréger, appeler GS[2]) abandonne assez facilement à de nouveaux globules, une partie de sa sensibilisatrice, pour devenir par exemple G S. Voilà un cas où le complexe est peu stable. Eh bien, si l'on se rapporte à ce que nous avons dit au début de cet article, lorsque nous rappelions l'expérience du sérum hémolytique (addition de globules en une fois ou par doses fractionnées) et que nous précisions la part qui revient à l'alexine dans le résultat obtenu, on déduit que le complexe « globule sensibilisé-alexine » (ou plus exactement stroma-alexine) est remarquablement stable. Des hématies détruites et chargées d'alexine ne cèdent pas cette matière à des globules nouveaux (même fortement sensibilisés). Ceci justifie les considérations précédentes relatives à la stabilité, variable suivant les cas, des complexes que l'on peut obtenir[1].

*
* *

On le voit, nous nous rallions entièrement, dans ces considérations, à l'hypothèse (bien corroborée par les expériences résumées plus haut) de la combinaison en proportions variables. Mais il n'est pas inutile de vérifier cette hypothèse dans ses conséquences les plus importantes.

On peut évidemment, pour évaluer la toxicité de n'importe quelle substance vénéneuse, se placer à deux points de vue très différents. En premier lieu, on peut apprécier la force d'un poison en déterminant le nombre de cellules ou d'animaux qu'un poids donné de cette matière est susceptible de tuer. On peut,

1. On peut, en recourant aux phénomènes de teinture, obtenir une image du phénomène de M. Morgenroth, — peut-être un peu grossière, mais assez intuitive. Tapissons d'une feuille de papier filtre la moitié environ du fond d'un cristallisoir. Versons alors une solution diluée de bleu. Au bout d'un certain temps, le papier se charge de couleur et en dépouille presque complètement le liquide. A ce moment, immergeons dans le liquide deux petits morceaux de papier-filtre, de manière que l'un de ces morceaux (A) aille se déposer au fond du cristallisoir dans la partie où le verre est à nu, l'autre (B) allant au contraire recouvrir en partie la feuille baignée depuis longtemps et déjà teinte en bleu. (On a soin de ne pas appuyer B sur celle-ci). On trouve, au bout d'un certain temps, que B est plus coloré que A. On voit aussi que la première feuille s'est décolorée dans tous les points qui se sont trouvés au voisinage de B, elle présente une tache plus pâle qui reproduit la forme de ce fragment B. La répartition de la couleur, entre l'ancienne feuille et le morceau, tend à devenir homogène, comme la sensibilisatrice, dans l'expérience de M. Morgenroth, tend à se partager également entre tous les globules présents.

d'autre part, estimer l'activité d'un toxique d'après le temps que celui-ci met à acccomplir son œuvre.

Considérons de l'alexine, additionnée d'une quantité faible d'anti-alexine. Pour préciser, supposons qu'on mélange, à 3/10 de c. c. d'anti-alexine, 12/10 de c. c. d'alexine (sérum frais de cobaye). On obtient ainsi 1,5 c. c. de liquide (*A*), qui, d'après notre hypothèse, renferme uniquement de l'alexine atténuée, — légèrement atténuée même, puisque la dose d'anti-alexine mise en jeu est relativement minime. En d'autres termes, celle-ci n'a pas agi en neutralisant complètement une portion de l'alexine, l'excès de cette substance restant inaltéré. Il ne s'agit donc pas d'une simple diminution, en quantité, de l'alexine active ; le phénomène est tout autre ; la totalité de l'alexine s'est transformée en un complexe encore toxique, mais qui l'est moins, et qui présente ce caractère de n'hémolyser qu'avec une remarquable lenteur, même lorsque la quantité des globules soumis à son action est minime.

Eh bien, puisque toute l'alexine présente a été transformée, mais qu'aucune portion n'en a été détruite à proprement parler, puisqu'il s'agit, non pas d'une diminution quantitative, mais bien d'une modification (atténuation légère) affectant qualitativement la totalité de l'alexine, on conçoit qu'un tel mélange puisse encore, malgré la lenteur de l'hémolyse qu'il opère, être néanmoins capable de détruire un nombre relativement considérable de globules rouges.

A notre mélange A, qui contient *beaucoup d'alexine* (atténuée il est vrai), comparons maintenant un second liquide B, de même volume, mais de constitution différente. Ce second mélange, nous l'obtenons en ajoutant, à du sérum inactif, nullement antialexique (tel que du sérum chauffé à 55°, de lapin ou de cobaye neuf) une *quantité fort petite* d'alexine normale. Cette mixture représente donc une dilution, dans un liquide inerte, d'une faible dose d'alexine active. On a par exemple un mélange comprenant, au lieu d'antialexine, 3/10 de sérum de lapin neuf (préalablement chauffé), et au lieu des 12/10 de c. c. d'alexine active, 1/10 de c. c. seulement d'alexine active, et 11/10 de cette même alexine, mais qui a été au préalable chauffée à 55°.

Si nous ajoutons, à ce second mélange B, une très petite quantité de globules de poule, fortement sensibilisés, on peut

prévoir qu'il les détruira avec une rapidité assez grande, car il contient de l'alexine normale, douée en conséquence de son énergie habituelle. Mais il contient peu d'alexine : l'hémolyse pourra donc faire défaut ou rester tout au moins très partielle, même au bout d'un temps très prolongé, si la quantité de sang sensibilisé introduite est considérable.

On le devine, nos deux mélanges A et B, dont le volume est le même et qui tous deux sont capables de produire l'hémolyse, auront a priori des propriétés inverses. Si l'on évalue leur énergie destructive en y introduisant un nombre de globules sensibilisés peu élevé, 1 goutte par exemple, B paraîtra plus actif que A : il détruira les globules plus rapidement. Mais on obtiendra le résultat opposé si on apprécie leur puissance d'après la quantité de globules qu'ils peuvent hémolyser. En effet, si l'on y ajoute une forte dose de ce même sang sensibilisé (1,5 de c. c. par exemple), on constatera, au bout d'un temps suffisamment prolongé (le lendemain) que ces hématies sont en grande majorité intactes dans B, sont toutes détruites dans A, où l'alexine est moins active « qualitativement », (rapidité d'action) mais où elle existe en quantité beaucoup plus grande.

Ceci résulte de notre hypothèse. Or, cette prévision se vérifie par l'expérience. Il est dès lors lors impossible, on le conçoit, d'admettre qu'une dose insuffisante d'anti-alexine, ajoutée à un sérum alexique, transforme ce liquide en un mélange d'alexine parfaitement neutralisée et d'alexine intacte. S'il en était ainsi, le liquide obtenu représenterait simplement une dilution d'alexine normale dans un certain volume de liquide inerte, et ses caractères seraient identiques à ceux de notre seconde mixture B, laquelle possède précisément cette constitution.



De ces expériences, portant uniquement sur l'alexine et l'anti-alexine, il ne serait pas légitime de tirer des conclusions trop générales, et l'étude attentive, au point de vue du mode de combinaison, de toxines et d'antitoxines nombreuses et variées, est nécessaire. Mais on nous permettra néanmoins de faire remarquer que divers faits, connus depuis longtemps, et qui semblaient assez énigmatiques, deviennent tout naturels et faci-

lement explicables si l'on adopte l'idée de l'union en proportions variables. Nous citerons un ou deux exemples :

On a constaté (notamment à propos du tétanos) qu'un mélange de toxine et d'antitoxine, inoffensif quand on l'injecte à un animal d'espèce A, manifeste une toxicité évidente quand on l'injecte à un animal d'espèce différente B. On connaît les faits de ce genre, signalés notamment par M. Buchner, MM. Roux et Vaillard. Or ces faits, bizarres en apparence, sont les conséquences presque nécessaires de l'hypothèse que nous avons exposée. En effet, un mélange de toxine et d'une dose d'antitoxine même faible, même insuffisante à saturer complètement le poison, ne renferme plus du tout de toxine se trouvant encore dans son état primitif. Le liquide ne contient plus qu'un complexe (toxine atténuée) qui, somme toute, est un corps nouveau, doué de caractères propres, qui a remplacé complètement la toxine originelle, et qui ne se comportera pas nécessairement de même vis-à-vis de tous les organismes. Il est fort naturel de prévoir que son pouvoir toxique sera assez atténué pour ne produire aucun trouble chez certaines espèces, d'autres espèces manifestant encore, à son action, une sensibilité réelle ; pourquoi, en effet, réagiraient-elles toutes identiquement vis-à-vis de ce composé nouveau? Bien plus, on peut théoriquement prévoir le cas où de la toxine, même entièrement saturée d'antitoxine, pourrait encore empoisonner certaines espèces ou certains individus. En effet, d'après notre conception, il n'existe pas de différence tranchée et radicale entre l'atténuation et la neutralisation d'une toxine, ou, plus exactement, il n'existe pas de neutralisation absolue. Il existe simplement une atténuation qui peut être poussée très loin, grâce à une saturation de plus en plus complète du poison par l'antitoxine. Pratiquement, cela équivaut très souvent à une neutralisation vraie, mais, en réalité, ce n'est pas la même chose. Quand on parle de neutralisation proprement dite, on implique que la toxine, grâce à une abolition radicale de ce qui la rendait dangereuse, est désormais forcément et irrévocablement inactive vis-à-vis même d'organismes hypersensibles. La sensibilité des organismes, en ce cas, est un élément qui n'intervient plus. Au contraire, cet élément intervient encore si l'on admet que l'apparente neutralisation n'est, au fond, qu'une atténuation très forte, ce qui est très

atténué pour un organisme A, pouvant l'être très peu pour un organisme B. La conception de l'atténuation plus ou moins marquée garde donc toute sa relativité, évoquant constamment l'idée d'un rapport entre la sensibilité de l'être vivant et le pouvoir nocif de la substance considérée.

On comprend dès lors qu'un complexe riche en antitoxine (toxine bien saturée de contre poison) et qui est inoffensif pour des animaux bien portants, puisse être dangereux pour des organismes débilités et sensibilisés par une infection antérieure ou un traitement vaccinal trop prolongé. Il est possible, semble-t-il, d'expliquer ainsi pourquoi on peut empoisonner, par la toxine diphtérique, des animaux fournisseurs d'un sérum antidiphtérique actif. La modification de la toxine s'opère, mais l'animal est devenu sensible même à la toxine saturée et très atténuée, laquelle eût été parfaitement tolérée par des organismes normaux. La sensibilité, vis-à-vis de toxine tétanique mêlée d'antitoxine[1], de cobayes immunisés contre le vibrion cholérique (Roux et Vaillard) est vraisemblablement un autre exemple du même fait.

Pour protéger contre l'alexine des globules rouges normaux, non sensibilisés par un immunsérum spécifique, une quantité relativement faible de sérum antialexique est suffisante. Ce dernier doit, au contraire, intervenir à grande dose si l'on veut mettre à l'abri de l'hémolyse des globules que cet immunsérum a rendus très sensibles à l'influence alexique. Le fait est facile à vérifier. MM. Morgenroth et Sachs[2] ont établi, dans le même ordre d'idées, qu'il faut plus d'antialexine pour protéger les globules, lorsque ceux-ci ont été fortement sensibilisés, que dans le cas où ils n'ont été impressionnés que par une faible dose de sensibilisatrice; en d'autres termes, le même complexe (alexine-antialexine) pourra se montrer inoffensif ou dangereux, suivant l'énergie de la sensibilisation.

Ceci nous amène à considérer les résultats observés par les expérimentateurs qui ont injecté aux animaux de la toxine partiellement neutralisée par de l'antitoxine. La substance injectée dans ces conditions n'est autre, nous le savons, que de

1. Bien entendu, ces mélanges sont, dans les expériences de ces savants, inactifs pour des cobayes normaux.

2. *Berliner klin. Wochenschrift*, 1902, n° 35.

la toxine atténuée, pouvant être bien tolérée par certains organismes, mais capable de déterminer, chez d'autres espèces plus sensibles, des troubles appréciables. Or, MM. Dreyer et Madsen, opérant sur la toxine diphtérique, ont constaté qu'un semblable mélange était complètement inactif pour le cobaye, provoquait au contraire des troubles assez légers (œdème, etc.), chez le lapin. Mais on aurait pu hausser d'un degré la toxicité d'une pareille mixture : il aurait suffi, en faisant varier quelque peu les doses respectives des deux substances antagonistes, de préparer un complexe un peu moins saturé d'antitoxine, un peu moins atténué. L'animal qui, dans l'essai précédent, n'éprouvait aucun phénomène morbide sera maintenant légèrement intoxiqué (œdème, etc.) ; celui qui se montrait déjà, dans une certaine mesure, sensible au mélange moins actif, présentera, cette fois, les symptômes d'un grave empoisonnement. Tels sont encore les résultats consignés par MM. Dreyer et Madsen.

Ces savants admettent que, dans les mélanges (préparés en proportions convenables, la saturation n'étant pas complète), on ne trouve plus, en fait de substance non combinée, que de la toxone, c'est-à-dire un poison différent de la véritable toxine, et qui est moins actif. Pour nous, cette toxone représente simplement notre complexe, formé schématiquement d'une molécule de toxine incomplètement saturée de molécules antitoxiques. En effet, ce complexe possède fort naturellement les caractères attribués à la toxone : il est, par définition, moins vénéneux que la toxine libre : il est aussi moins avide d'antitoxine, ses affinités étant déjà partiellement satisfaites. Il se rattache évidemment à la toxine par son origine et sa composition, mais constitue néanmoins un corps nouveau, et l'on conçoit dès lors que les symptômes morbides qu'il provoque ne soient pas forcément identiques à ceux que fait naître l'injection d'un peu de toxine ordinaire, simplement diluée. Enfin, comme il contient le radical toxique, son introduction dans l'organisme peut logiquement donner lieu à l'apparition, dans le sang, du pouvoir antitoxique. MM. Dreyer et Madsen ont constaté, on le sait, qu'on peut obtenir de l'antitoxine en injectant aux animaux ce qu'ils appellent la toxone [1].

Ajoutons d'autre part (puisque nous mettons en doute

1. *Zeitschrift f. Hygiene*, tome XXXVII, 1901.

l'authenticité des toxones en tant que substances distinctes et particulières) que nos réserves ne visent nullement les résultats consignés par M. Ehrlich, et relatifs à l'affaiblissement spontané (sans aucune intervention d'antitoxine) que diverses toxines subissent quand on les conserve pendant longtemps (apparition des toxoïdes aux dépens de la toxine). L'influence antitoxique est pour les toxines un facteur d'atténuation. Mais rien ne s'oppose à ce qu'il en existe d'autres (oxygène, lumière, réactions lentes et peu définies, etc., etc.), susceptibles également de produire, sur l'activité de la toxine, des effets dépressifs similaires.

SUR LES HÉMOLYSINES CELLULAIRES

PAR C. LEVADITI.

(Laboratoire de M. Metchnikoff)

Divers savants ont abordé récemment la question de l'origine de la cytase hémolytique des sérums. On savait, depuis les recherches du regretté Buchner et de ses élèves, depuis les constatations de Denys et de l'école de Louvain, de Schattenfroh, Bail, Löwit, etc., qu'il existe des relations étroites entre la cytase bactériolytique (*alexine*) et les globules blancs ; on avait d'autre part décelé dans les leucocytes, grâce à divers procédés d'extraction, certains principes microbicides ayant plus d'une analogie avec cette cytase. Dès lors, il était indiqué de rechercher si la cytase hémolytique, à l'instar de l'alexine bactéricide, ne provenait pas également des globules blancs, et si les mêmes modes d'extraction ne permettaient pas d'isoler cette cytase. Ce qui venait surtout à l'appui d'une telle supposition, c'est la notion de l'absence de cytase circulant à l'état de liberté dans les humeurs des organismes vivants, notion avancée pour la première fois par M. Metchnikoff, et vérifiée depuis par les expériences de Gengou[1], Bordet[2] et les nôtres[3].

M. Schattenfroh[4] a constaté le premier que les extraits de leucocytes polynucléaires étaient entièrement dépourvus de propriétés hémolysantes. Il fallait donc chercher dans une autre direction, que l'observation faite *in vivo* ne tarda pas à indiquer. M. Metchnikoff[5], dans ses études sur la résorption des cellules, avait déjà établi que les seuls globules blancs qui interviennent d'une façon active, pour englober et digérer les éléments cellulaires d'espèce étrangère, sont les *macrophages*, en particulier ceux de

1. GENGOU, Ces *Annales*. v. XV, p. 68.
2. J. BORDET, *Annales de la Soc. roy. des sciences médic. de Bruxelles*, vol. IV, 1895.
3. LEVADITI, Ces *Annales*, 1901 et 1902.
4. SCHATTENFROH, *Arch. fur Hyg.* 1899, v. XXXV, p. 135, et *Münch med. Woch.* 1898.
5. METCHNIKOFF, Ces *Annales*, 1899, p. 757.

la rate et des ganglions lymphatiques. S'appuyant sur une notion dont la généralité n'est plus à mettre en doute, à savoir qu'entre la digestion qui s'opère au sein des cellules et celle qui s'accomplit en dehors du protoplasma, il y a des relations étroites, ce savant avait supposé que la diastase qui assure à l'intérieur des macrophages la dissolution des hématies est à rapprocher de la cytase hémolytique du sérum. En soumettant cette supposition au contrôle de l'expérience, M. Metchnikoff constate que l'*émulsion* de cellules puisées dans les ganglions lymphatiques et la rate du cobaye, organes constitués presque exclusivement par des macrophages, possède, à l'encontre des parenchymes hépatique et rénal, un fort pouvoir hémolytique. Il voit, de plus, qu'il suffit de soumettre cette bouillie cellulaire à l'influence d'une température avoisinant 56°, pour détruire complètement ce pouvoir hémolytique.

Ces observations, confirmées par Klein [1] et Shibayama [2], ont été reprises par Tarasséwitch [3]. Nous n'insisterons pas sur le travail de cet auteur; le lecteur le lira avec intérêt dans ces *Annales* mêmes. Nous rappellerons, néanmoins, que Tarasséwitch a réussi à isoler des macrophages, au moyen de l'extraction prolongée par l'eau salée, des hémolysines qu'il identifie avec la cytase du sérum, s'appuyant surtout sur le fait que ces hémolysines sont *thermolabiles* [4]. Il a essayé également d'établir une séparation tranchée entre la cytase des macrophages (*macrocytase*) et la cytase des leucocytes polynucléaires (*microcytase*), la première était exclusivement hémolytique, la seconde essentiellement bactériolytique.

Peu de temps après la publication du travail de Tarasséwitch, apparaît un mémoire de MM. Korschun et Morgenroth [5], où les auteurs établissent qu'il n'y a aucun rapport entre la macrocytase et la cytase du sérum. Ils remarquent, en effet, que les principes hémolytiques renfermés dans les extraits d'organes

1. Klein, *Société impériale des médecins de Vienne*, 20 déc. 1991 (*Wien. kl. Woch.*, 1901, n° 52.)

2. Shibayama, *Cbt. fur Bakt.*, 1901, n° 21, p. 760.

3. Tarasséwitch, Ces *Annales*, 1902, n° 2.

4. Suivant Tarasséwitch, le chauffage de ces hémolysines à 56° donne des résultats variables; par contre, les températures plus élevées (58°,5; 60°; 62°), appliquées pendant 1 à 2 heures, réussissent à inactiver entièrement ces hémolysines.

5. Korschun et Morgenroth, *Berl. kl. Woch*, 1902, n° 37.

(en particulier ceux de l'estomac, de l'intestin, du pancréas, des glandes lympathiques et de la rate) sont, à l'encontre de cette cytase, *thermostabiles*, *autohemolytiques* et *solubles dans l'alcool* Ces principes, d'après Korschun et Morgenroth, ont une certaine analogie avec les composés bactéricides également thermostabiles, découverts par Conradi [1] dans les organes en voie d'*autolyse*, et proviennent probablement, affirment ces auteurs sans toutefois en apporter la preuve, de l'autolyse des tissus étudiés. Citons enfin le travail de Sawtschenko [2], antérieur à celui des auteurs allemands, et les publications récente de Donath et Landsteiner [3] et de Dömeny [4], qui aboutissent aux mêmes conclusions que le mémoire de Korschun et Morgenroth.

C'est là l'historique concis des études concernant l'origine de la cytase hémolytique. On voit qu'une contradiction manifeste existe entre les constatations de Tarasséwitch et celles de Korschun et Morgenroth, contradiction qui touche au domaine des faits et qui mérite d'être contrôlée. Bien entendu, la discussion porte moins sur la conception de Metchnikoff, puisque cette conception s'appuie essentiellement sur des observations faites dans l'organisme vivant, observations sur lesquelles aucun doute n'a été exprimé jusqu'à présent.

Nous avons repris la question des hémolysines cellulaires, et nous avons porté notre attention sur les ganglions lymphatiques et les leucocytes polynucléaires des exsudats. Ce qui nous a le plus importé au cours de ce travail, ce fut d'une part la *nature et le mécanisme de production de ces hémolysines cellulaires*, et, d'autre part, le *mode suivant lequel se comportent les deux grandes classes de globules blancs, les macrophages et les leucocytes polynucléaires, au point de vue hémolytique et bactériolytique.*

Méthode. — Nous avons eu soin de saigner préalablement les animaux, pour éviter autant que possible les causes d'erreur attribuables à la présence du sang dans les organes dont nous examinions le pouvoir hémolytique. Il va sans dire que, malgré toutes les précautions prises pendant l'opération, la saignée réalisée au moyen de l'ouverture des carotides était loin d'être par-

1. Conradi, *Beitr. zur chem. Physiol*, vol. I, f. 5 et 6, 1901.
2. Sawtschenko, *Arch. de Podwyssosski*, vol. XIV, f. 3, p. 796.
3. Donath et Landsteiner, *Wien. kl. Rundschau*, 1902, n° 40.
4. Domeny, *Wien. kl. Woch.*, 1902, n° 40, p. 1025.

faite. Néanmoins, étant donné que même l'injection d'eau salée dans le système vasculaire n'aboutit pas à des résultats absolument rigoureux, nous nous sommes contentés de la saignée simple, et nous avons soumis les organes à une série de lavages avant de les utiliser à la préparation des extraits.

Nous avons préparé ainsi deux ordres d'extraits : *l'extrait rapide* et *l'extrait tardif.*

L'*extrait rapide* était obtenu en triturant sur une toile métallique des ganglions lymphatiques préalablement découpés, et en émulsionnant la masse cellulaire dans un volume donné d'eau physiologique [1]. Après un court séjour à la température de la chambre (1 à 2 heures), on décantait le liquide surnageant et on soumettait ce liquide à la force centrifuge. On obtenait ainsi un liquide transparent, dépourvu de particules solides, parfois sensiblement opalescent [2].

L'*extrait tardif* différait du précédent par le fait qu'avant de centrifuger la bouillie cellulaire, on la laissait séjourner pendant 3 ou 5 heures à 38°, et jusqu'au lendemain à 8° (glacière). Des modifications de nature diastasique pouvaient ainsi s'opérer pendant le séjour de l'extrait à la température du thermostat, modifications que l'on évitait quand on préparait cet extrait suivant la méthode rapide.

L'hémolyse a été pratiquée suivant le procédé couramment employé ; on avait soin d'égaler le volume des mélanges en ajoutant de l'eau salée à 7,5 0/0, et de faire les observations à divers intervalles pendant le séjour des tubes à essai tout d'abord à 38°, ensuite à la glacière [1].

1. Parfois nous nous sommes servi de l'appareil de M. Borrel (*C. R. de la Soc. de Biolog*, 1903).

2. Lorsque l'opalescence était trop accentuée, on filtrait le liquide sur du papier Berzélius, préalablement mouillé.

3. Voici les abréviations que nous avons employées pour marquer les résultats de l'expérience :

c = dissolution complète.
pc = — presque complète :
bcp = beaucoup de dissolution ;
par = dissolut. partielle ;
peu = peu de dissolution ;
tr = trace de dissolution ;
0 = pas de dissolution.

I

SUBSTANCES HÉMOLYTIQUES THERMOSTABILES DES GANGLIONS LYMPHATIQUES

Lorsqu'on met en contact des globules rouges de cobaye ou d'oie avec un extrait *tardif* préparé à l'aide de pancréas Aselli de lapin, on constate qu'après un intervalle de temps qui varie entre 2 et 3 heures, ces globules entrent en dissolution. L'hémolyse est lente et ne s'achève le plus souvent que le lendemain. On saisit ainsi une différence frappante entre cette hémolyse et celle que les sérums neufs exercent sur les mêmes globules rouges ; dans ce dernier cas, la sortie de l'hémoglobine est de beaucoup plus rapide, voire même plus complète. Cette différence s'accentue encore plus lorsqu'on étudie l'action dissolvante exercée par ces principes sur les globules rouges fournis par l'espèce animale d'où proviennent les ganglions et la cytase. On voit alors qu'à l'encontre de la plupart des sérums neufs (exception faite du sérum de chien), l'extrait tardif de ganglions lymphatiques dissout ces globules et jouit, par conséquent, de propriété *iso* et *autohémolytiques*.

Il en est de même de l'influence exercée par le chauffage à diverses températures sur le pouvoir hémolytique de ces extraits ganglionnaires tardifs. Tandis que l'action dissolvante de la cytase disparaît entièrement, sauf dans de rares exceptions[1], vers 56°, les propriétés hémolysantes des extraits des mononucléaires résistent à des températures beaucoup plus élevées; l'ébullition même, comme l'ont déjà vu MM. Korschun et Morgenroth, ne réussit pas à anéantir ces propriétés. Les expériences que nous avons entreprises à ce sujet nous ont montré que, d'une part, le pouvoir hémolysant de l'extrait macrophagique tardif ne fait que s'atténuer vers 100°, et que, d'autre part, si, après le chauffage, le liquide surnageant est pour ainsi dire dépourvu d'action hémolytique, cela tient au fait que le principe hémolysant est entraîné par le précipité albumineux formé à cette température.

Mais les différences qui existent entre la cytase du sérum et les substances hémolytiques des extraits ganglionnaires, ne se bornent pas là. Si l'on s'adresse à certains agents qui fixent

1. MM. Ehrlich et Morgenroth ont décrit une cytase (complément) thermostabile.

énergiquement cette cytase, telles les macérations d'organes (v. Dungern), ou la levure de bière (Ehrlich et Sachs), on voit que ces agents n'exercent presque aucune action sur l'hémolysine macrophagique.

EXPÉRIENCE I. — *Fixation de la cytase et des hémolysines ganglionnaires par le foie et les cellules de levure.* — On prépare, à l'aide de 5 grammes de foie de cobaye, une bouillie cellulaire que l'on lave plusieurs fois, et que l'on répartit en deux récipients *a* et *b*. On verse dans le premier de ces récipients, 4 c. c. de sérum frais de cobaye neuf; on introduit dans le second une quantité égale d'un extrait tardif de ganglions de lapin. Après un séjour de 2 heures à 38° et de 20 heures à 8°, on sépare les cellules au moyen de la force centrifuge. On dispose de la même manière une nouvelle expérience, où, au lieu de se servir de cellules hépatiques, on emploie une émulsion épaisse de levure de bière, préalablement lavée. On essaye le pouvoir hémolytique des liquides obtenus, vis-à-vis des érytrocytes de cobaye.

Quantité de liquide.	FIXATION PAR LE FOIE				FIXATION PAR LA LEVURE			
	Cytase.		Extrait gangl.		Cytase.		Extrait gangl.	
	Témoin.	Foie.	Témoin.	Foie.	Témoin.	Levure.	Témoin.	Levure.
0,05	pc	0	—	—	—	—	tr	peu
0,3	c	0	—	—	—	—	c	c
0,5	c	0	bcp	tr	pc	0	c	c
0,75	c	0	c	pc	c	0	c	c
1,0	c	tr	c	c	c	0	c	c
1,5	c	peu	c	c	c	0	c	c
1,75	c	bcp	c	c	c	peu	c	c

De plus, il est aisé de constater que les sérums normaux, préalablement maintenus pendant 1/2 heure à 56°, exercent, comme l'ont déjà vu MM. Korschun et Morgenroth, une action empêchante à l'égard de l'hémolysine ganglionnaire, et cela à des doses qui restent inefficaces vis-à-vis de la cytase.

Il résulte de l'ensemble de ces faits que l'on ne saurait identifier les principes hémolysants renfermés dans les extraits *tardifs* de ganglions lymphatiques avec la cytase, ces deux ordres de substances se comportant différemment tant au point de vue de leurs propriétés dissolvantes qu'à l'égard de leur résistance à chaleur. D'autre part, le fait que l'hémolysine ganglionnaire n'est pas influencée par des températures nuisibles à la plupart des diastases, suggère l'idée que cette hémolysine, loin d'être de

nature enzymatique, se rapproche plutôt des corps cristalloïdes.

MM. Korschun et Morgenroth ont déjà vu que si l'on a soin d'épuiser par l'alcool un extrait *tardif* de pancréas, on constate que le produit alcoolique acquiert des propriétés dissolvantes vis-à-vis des globules rouges ; ces auteurs ont conclu que les hémolysines des tissus sont solubles dans l'alcool. Nous avons soumis à une série d'études dirigées dans cette direction les principes hémolysants des extraits tardifs de ganglions lymphatiques, et nous avons constaté que ces principes se dissolvent non seulement dans l'alcool, mais aussi dans l'éther et le chloroforme. Ces études, que nous avons suivies grâce aux conseils bienveillants de M. G. Bertrand, nous ont amené à conclure que les produits hémolysants des macrophages ne sont pas de nature albuminoïde, mais très probablement des substances capables de cristalliser. Voici quelques-unes de nos expériences :

Expérience II. — *Passage de la substance hémolytique thermostabile des ganglions lymphatiques dans l'alcool faible.* — 8 c. c. d'extrait *tardif* de ganglions lymphatiques de lapin sont traités avec 3 volumes d'alcool absolu. Le précipité formé est recueilli, lavé, et suspendu dans 8 c. c. d'eau salée isotonique. Ce précipité se dissout incomplètement ; on sépare la partie non dissoute, que l'on reprend avec le même volume d'eau salée ; On a ainsi préparé :

a) Une partie insoluble dans l'alcool faible, insoluble dans l'eau salée.

b) Une partie insolube dans l'alcool faible, soluble dans l'eau salée.

D'autre part, l'extrait alcoolique est évaporé au bain marie jusqu'à la dessiccation complète ; on obtient 0gr,1 d'une masse jaunâtre, ayant un aspect graisseux, que l'on suspend dans 8 c. c. d'eau salée (*c*).

On apprécie le pouvoir hémolysant des liquides *a*, *b* et *c*, vis-à-vis des érytrocytes de cobaye.

Quantité de liquide.	INSOLUBLE DANS ALCOOL		Soluble dans alcool.
	Soluble eau salée.	Insoluble eau salée.	
0,1	tr	tr	par
0,5	tr	tr	par
0,75	tr	tr	c
1,0	0	tr	c
1,5	0	tr	c

Expérience III. — *Passage de la substance hémolytique thermostabile des ganglions lymphatiques dans l'alcool fort.* 48 c. c. d'extrait tardif de ganglions lymphatiques de lapin, macérés dans l'eau distillée, sont traités avec

3 volumes d'alcool absolu. Le *précipité* recueilli après une heure de contact, est lavé et desséché dans le vide, il pèse 0gr, 225. On le reprend avec 24 c. c. d'eau salée isotonique; la dissolution, après 4 heures de séjour à 8°, est incomplète. On sépare le résidu, que l'on suspend dans le même volume d'eau salée, et on laisse macérer pendant 24 heures à la glacière. On a ainsi :

a) Partie insoluble dans l'alcool faible, *soluble* dans l'eau salée.

b) — — — — — *insoluble* — — —

L'*extrait alcoolique* (alcool faible) est évaporé dans le vide; il pèse 0gr, 126. On le reprend avec 1 c. c. d'eau salée et on ajoute 19 c. c. d'alcool absolu. Il se forme un nouveau précipité (*partie insoluble dans l'alcool fort*) que l'on sépare et suspend dans 24 c. c. d'eau salée. Après 2 heures de séjour à la glacière, la dissolution n'est pas complète. On soumet le liquide à la force centrifuge et on délaye le dépôt dans le volume initial de solution isotonique. On a ainsi préparé :

c) Partie insoluble dans l'alcool fort, *soluble* dans l'eau salée.

d) — — — — — *insoluble* — — —

D'autre part, l'*extrait alcoolique* (alcool fort) est évaporé dans le vide, le résidu pèse 0gr, 103. On reprend ce résidu avec 24 c. c. d'eau salée, et on prépare comme précédemment la partie soluble et insoluble dans l'eau salée (*e* et *f*). On apprécie le pouvoir hémolytique de ces liquides vis-à-vis des érytrocytes de cobaye.

Quantité de liquide.	SOLUBLE ALCOOL FAIBLE				Insol. alcool faible.	
	Sol. alcool fort.		Insoluble alcool fort.			
	Soluble eau salée.	Insoluble eau salée.	Soluble eau salée.	Insoluble eau salée.	Soluble eau salée.	Insoluble eau salée.
0,25	tr	c	0	0	0	0
0,5	tr	c	0	0	0	0
0,75	tr	c	0	0	0	0
1,5	par	c	0	0	0	0

Les résultats fournis par ces recherches permettent de déduire la conclusion suivante :

1° Les principes hémolysants contenus dans l'extrait tardif des ganglions lymphatiques sont solubles dans l'alcool faible et l'alcool fort;

2° Le précipité albumineux obtenu au moyen de l'alcool fort ne possède qu'un faible pouvoir hémolysant, ce qui peut s'expliquer en admettant qu'une partie des corps hémolytiques, soluble dans l'alcool, est entraînée mécaniquement par ce précipité;

3° Les mêmes corps hémolytiques, solubles dans l'eau au début de l'expérience, deviennent, une fois repris par l'alcool, presque insolubles dans l'eau salée isotonique. L'hémolyse que l'on obtient lorsqu'on fait agir l'émulsion aqueuse du résidu alcoolique sur les globules rouges s'opère grâce à une dissociation lente des corps hémolysants, dissociation qui a lieu à la température de 38°. Au fur et à mesure que cette dissociation se produit, ces corps sont absorbés par les érytrocytes, qui entrent ainsi en dissolution.

Les expériences IV et V, dont nous nous dispensons de donner les détails, montrent de plus que non seulement les extraits des ganglions lymphatiques, mais aussi ceux d'autres organes, en particulier le foie, la rate et le cerveau, renferment des substances hémolysantes solubles dans l'alcool. Elles font voir également que ces *hémolysines thermostabiles sont solubles dans l'éther et le chloroforme*. Néanmoins, ce dernier dissolvant ne réussit pas à extraire entièrement ces hémolysines. Il s'opère dans ces conditions, une sorte de répartition, qui dépend sans nul doute du temps d'action et de l'intensité de l'épuisement.

La conception suivant laquelle les substances hémolysantes renfermées dans les extraits tardifs des ganglions lymphatiques seraient de nature cristalloïde, devient ainsi fort plausible. Quelle peut-être la constitution chimique de ces substances? Il est difficile de se prononcer avec certitude, étant donné que la quantité de résidu alcoolique dont on dispose est restreinte et que, d'autre part, des corps n'ayant peut-être aucun rapport avec les vrais principes hémolysants souillent ces extraits et rendent les analyses difficiles.

Néanmoins, nous avons soumis soit l'extrait alcoolique, soit les produits insolubles dans le chloroforme, à une série d'essais préliminaires, et nous avons recherché surtout les principes résultant de la dissociation des matières protéiques et des graisses. Bon nombre d'arguments, comme on le verra au cours de ce mémoire, viennent à l'appui de la conception suivant laquelle les principes hémolytiques des extraits tardifs de ganglions lymphatiques résultent de l'*autolyse* qui s'opère au sein de ces extraits, autolyse qui intéresse d'une part les matières protéïques, d'autre part les graisses. Par suite, il était indiqué de rechercher les réactions chimiques des solutions aqueuses des

extraits alcooliques et de diriger l'attention particulièrement sur les *acides amidés* et les *dérivés des graisses*.

Réactions chimiques. — *a*) *Extrait tardif de ganglions mésentériques de lapin; partie soluble dans l'alcool fort, préalablement épuisée par l'éther.* Réaction acide au tournesol. Absence de matières protéiques. Renferme des matières organiques. Laisse, après calcination, des cendres alcalines, qui donnent les réactions des chlorures et des sulfates. Chauffé avec de la soude, donne des vapeurs ammoniacales.

b) *Même extrait; partie soluble dans l'alcool fort, insoluble dans le chloroforme.* Absence de matières protéiques. Réaction acide au tournesol. On obtient, après calcination, des cendres alcalines (K et peu de Na). Renferme des matières organiques et donne, avec la potasse, des vapeurs d'ammoniaque. Absence de savons.

Ces essais montrent en premier lieu que les *principes hémolytiques thermostabiles des ganglions lymphatiques ne sont pas de nature albuminoïde*, ces substances ne donnant aucune des réactions caractéristiques des matières protéiques. En second lieu, ces observations prouvent que les solutions qui renferment ces principes contiennent des matières organiques acides et de l'azote, ce qui plaide en faveur de la présence des acides amidés. Enfin, le fait que l'éther et le chloroforme réussissent à extraire, en partie du moins, ces hémolysines thermostabiles, amène à penser que certaines de ces hémolysines sont en rapport avec les graisses et leurs dérivés (*acides gras et savons alcalins* [1]).

Il devient ainsi extrêmement probable *qu'au cours de l'*autolyse *qui s'opère au sein des extraits macrophagiques* (voir plus loin), *il se forme d'une part des acides amidés, d'autre part des acides gras et des savons alcalins, corps capables d'exercer une influence dissolvante sur les érytrocytes.* D'ailleurs les expériences que nous avons entreprises avec plusieurs acides amidés nous ont montré que certains de ces acides (acide aspartique, chlorhydrate d'acide glutamique) jouissent de propriétés hémolysantes, et que ces propriétés sont intimement liées à la fonction acide de ces corps. Les sels neutres de soude se montrent en effet indifférents à l'égard des globules rouges. De plus, la neutralisation de l'extrait alcoolique de ganglions lymphatiques, dont la réaction est sensiblement acide, suffit pour enlever à cet extrait

1. Dans un travail paru pendant la rédaction de ce mémoire, MM. Kyes et Sachs (Zur Kenntniss der Cobragift activiren den Substanzen. *Berl. kl. Woch.*, 1903, n°s 2-4) attribuent également aux acides gras, dont ils ont recherché le pouvoir hémolytique, les propriétés dissolvantes des extraits d'organes.

son pouvoir hémolytique. L'expérience suivante, faite à l'aide de la partie insoluble dans le chloroforme de l'extrait alcoolique de rate, aboutit à un résultat semblable.

EXPÉRIENCE VI. — *Influence de la neutralisation sur le pouvoir hémolytique de l'extrait de rate.* On emploie la partie insoluble dans le chloroforme de l'extrait alcoolique de rate de lapin. Réaction acide au tournesol; on neutralise à l'aide d'une solution déci-normale de soude. Érytrocytes de cobaye.

Quantité de liquide.	Réaction.	Résultat.
2,2	acide	pc
2,2	neutre	0

CONCLUSIONS. *Les observations exposées jusqu'ici permettent de conclure qu'on ne saurait pas identifier les hémolysines contenues dans les extraits* TARDIFS *des ganglions lymphatiques avec la cytase des sérums neufs, pour le motif que ces hémolysines, à l'encontre de cette cytase, sont thermostabiles, iso et autohémolytiques, et neutralisables par le sérum normal; de plus, elles offrent certaines propriétés d'adhésion et de solubilité qui les rangent parmi les corps cristalloïdes. D'autre part, il est probable qu'il ne s'agit pas d'une seule substance hémolysante, mais de plusieurs principes différant entre eux par leur constitution chimique, et se rapprochant, d'une part des acides amidés, d'autre part des graisses et de leurs dérivés, les acides gras et les savons*[1].

II

FORMATION DES SUBSTANCES HÉMOLYTIQUES THERMOSTABILES DANS LES EXTRAITS DE GANGLIONS LYMPHATIQUES.

Nous avons étudié dans une nouvelle série d'expériences l'origine des substances hémolysantes thermostabiles renfermées

1. Nous désirons mentionner ici même qu'il nous a été possible de déceler la présence d'hémolysines thermostabiles dans le sérum de lapin neuf. On peut mettre en évidence ces substances, soit à l'aide de l'extraction par l'alcool, soit au moyen du chauffage à 70°, ou mieux à 100°. Ces substances existent dans le sérum à côté d'un principe empêchant *thermolabile*, qui masque leur présence. En portant le sérum à ces températures, on détruit ce principe empêchant, et on met à jour ces corps hémolysants thermostabiles. Il va sans dire que ces corps n'ont aucun rapport avec la cytase, puisque, d'une part, un sérum préalablement inactivé à 56° (destruction de la cytase) et porté ensuite à 100°, continue à dissoudre les globules rouges, et que, d'autre part, ces hémolysines thermostabiles sont autohémolysantes.

dans les extraits de ganglions lymphatiques. Le fait que ces substances peuvent être obtenues au moyen de l'extraction par l'alcool nous a permis de préciser si ces hémolysines préexistent dans les ganglions frais, ou bien si elles se forment pendant le séjour de ces ganglions en dehors du corps animal. Des recherches que nous avons entreprises dans cette direction nous ont montré que, chez le lapin, les organes lymphatiques, examinés immédiatement après la saignée de l'animal, renferment déjà des hémolysines solubles dans l'alcool et que, au fur et à mesure que l'émulsion cellulaire séjourne à 38° et à la glacière, la quantité de ces hémolysines augmente sensiblement. Par contre, chez le cobaye, le ganglion frais ne contient que des traces de principes hémolysants solubles dans l'alcool; la plus grande partie de ces principes naissent pendant le séjour de l'émulsion en dehors du corps animal.

Quel peut être le processus suivant lequel s'opère la formation de ces hémolysines thermostabiles dans les ganglions lymphatiques ? L'hypothèse qui cadre le mieux avec les faits exposés jusqu'ici, et qui se trouve pleinement confirmée par les observations qui vont suivre, est celle de l'*autolyse*. Cette hypothèse nous a été suggérée par une discussion que nous avons eue avec M. Delezenne au sujet de l'influence de la chaleur sur les propriétés hémolytiques du suc pancréatique de chien, obtenu au moyen de la fistule permanente [1]. Dans les expériences que nous faisions indépendamment de M. Delezenne, nous constations que le chauffage prolongé de ce suc à 70° ne réussissait pas à détruire ces propriétés. Par contre, M. Delezenne voyait le pouvoir hémolytique de ce suc disparaître promptement à cette température. Cette contradiction dans les résultats obtenus n'était qu'apparente. Elle s'expliquait par le fait que M. Delezenne chauffait le suc pancréatique immédiatement après la prise, tandis que dans nos expériences, nous soumettions ce suc à l'influence des températures élevées après un temps variable de séjour à la glacière. Or, pendant ce séjour, le suc pancréatique s'autolyse avec une extrême intensité et, au cours de cette autolyse, il se développe des principes hémolysants qui ne sont nullement influencés par le chauffage. Si ce chauffage, appliqué immédiatement après le puisement du suc pancréatique, enlève

1. Voir à ce sujet la communication récente de MM. Delezenne et Pozerski, *C. R. Soc. de Biologie*, 1903, 7 février.

à ce suc ses propriétés hémolytiques, c'est qu'il détruit la *diastase autolysante*, dans ce cas la trypsine, et entrave ainsi la genèse des principes hémolysants.

Cette interprétation s'applique également aux ganglions lymphatiques. On sait, en effet, depuis les recherches de Salkowski [1] et de ses élèves Schwiening [2] et Biondi [3], de Jakoby [4], de Conradi [5], etc., que les divers parenchymes, en particulier le foie et le poumon, maintenus à 38°, dans des conditions d'asepsie rigoureuse, sont capables de s'autolyser et d'engendrer des principes dérivés de la digestion des matières albuminoïdes (acides amidés, etc.). Cette autolyse des organes s'opère grâce à une diastase peptonisante d'origine cellulaire, comme le montrent les expériences de Salkowski, où l'on voit que le chauffage préalable des organes à la température de 100°, température à laquelle cette diastase autolysante se détruit, empêche sensiblement l'autolyse [6].

Nous avons soumis l'hypothèse de l'origine autolytique des hémolysines ganglionnaires au contrôle de l'expérience et nous avons cherché tout d'abord si, *en portant le plus rapidement possible l'émulsion cellulaire à une température qui détruit le diastase autolysante, il était possible d'entraver la formation de ces hémolysines*. *A priori*, ces recherches doivent mieux réussir avec les macrophages de cobaye, puisque dans ce cas la formation des principes hémolysants thermostabiles a lieu surtout pendant le séjour des extraits en dehors du corps animal.

Expérience VII. — *L'émulsion cellulaire de ganglions de cobaye, chauffée pendant 1 heure 1/4 à 61°,5, perd ses propriétés hémolytiques.* Les ganglions mésentériques prélevés sur 6 cobayes, sont triturés et suspendus dans 30 c. c. d'eau salée isotonique, On porte le plus rapidement possible une partie de cette émulsion cellulaire à 61°,5 pendant 1 heure 1/4. On apprécie le pouvoir hémolytique de la bouillie cellulaire chauffée et non chauffée, vis-à-vis des érytrocytes d'oie.

Le résultat est le même si le chauffage immédiat de l'émulsion cellulaire a lieu à 68° (25 m.), 70° (1/2 h.) et 70°,5 (45 m.).

1. Salkowski, *Zeitschr. für kc. Med.* vol. XVII, 1890 (vol. supplémentaire).
2. Schwiening, *Virch. Arch.*, vol. CXXXVI, p. 444.
3. Biondi, *Virch. Arch.*, vol. CXLIV, p. 373.
4. Jakoby, *Zeitschr. für physiol. Chemie*, vol. XXX, 1900.
5. Conradi, *Beitr. zur chem. Physiol.*, vol. I, 1902, p. 136.
6. Rappelons que Conradi a trouvé dans les extraits et organes autolysés des principes hémolytiques thermostabiles (*Beitr. zur chem. Physiol.*, vol. I, 1902, p. 144).

Quantité d'émulsion.	ÉMULSION NON CHAUFFÉE; RÉSULTAT APRÈS					Em. chauffé.
	2 h. 40'.	3 h. 40'.	4 h.	7 h.	20 h.	2 h. — 20 h.
0,1	0	0	0	tr	peu	0
0,25	0	0	0	par	bcp	0
0,5	0	0	pc	c	c	0
0,75	0	c	c	c	c	0
1,0	peu	c	c	c	c	0
1,5	par	c	c	c	c	0

Expérience VIII. — *L'extrait rapide de ganglions de cobaye, chauffé pendant 1 heure à 56°, perd son pouvoir hémolytique.* — On prépare un extrait *rapide* au moyen des ganglions mésentériques prélevés sur 8 cobayes. On porte le plus rapidement possible une partie de cet extrait à 56° pendant 1 heure, et on apprécie son pouvoir hémolytique vis-à-vis des globules rouges de lapin.

Quantité d'extrait.	Non chauffé.	Chauffé à 56°.
0,1	tr	0
0,5	peu	0
0,75	pc	0
1,0	c	0
1,5	c	0
2,0	c	0

Ces expériences montrent que si l'on a soin de soumettre soit l'émulsion cellulaire, soit l'extrait rapide de ganglions lymphatiques de cobaye à l'influence de la chaleur, on enlève tout pouvoir hémolytique à cette émulsion ou à cet extrait. Dans ce cas, la chaleur, en détruisant la diastase autolysante, suspend l'autolyse et empêche la genèse des dérivés thermostabiles doués de propriétés hémolytiques. C'est là une vérification absolue de l'expérience de M. Metchnikoff, dont nous avons parlé au commencement de ce mémoire. Il va sans dire que cette recherche ne réussit qu'à la condition de faire intervenir la chaleur le plus rapidement possible, pour le motif que si on laisse s'écouler un certain intervalle entre la préparation de l'extrait et le chauffage, l'autolyse peut s'opérer et aboutir à la formation de principes hémolytiques thermostabiles.

Nous avons précisé ce dernier point du problème, en recherchant quel est le moment où l'inactivation de l'extrait ganglion-

naire est encore possible. Voici quelques expériences ayant trait à ce sujet :

EXPÉRIENCE IX. — *Influence du temps sur la formation des hémolysines thermostabiles. a) Émulsion ganglionnaire.* On prépare une émulsion cellulaire à l'aide de ganglions mésentériques prélevés sur 6 cobayes. On met une partie de cette émulsion en contact avec 1 goutte de sang d'oie, et on marque le moment où l'hémolyse est complète.

Temps.	Emulsion non chauffée : 0,75.	Émulsion ch. à 61°5 : 0,75
2 h. 40	0	0
3 h.	c	0
4 h.	c	0
7 h.	c	0
20 h.	c	0

Il résulte que la dissolution des globules rouges s'achève vers la 3e heure. Il s'agit de préciser si les principes hémolytiques qui, à ce moment, agissent sur ces globules, sont thermolabiles ou thermostabiles. Pour cela, on a soin de mettre à 38°, en même temps que les tubes de l'expérience précédente, ce qui restait de l'émulsion cellulaire, et de retirer une partie de cette émulsion au moment où l'hémolyse était complète dans ces tubes (3e heure). On se débarrasse des cellules au moyen de la force centrifuge et de la filtration, et on répartit le liquide en deux portions *a* et *b*. On soumet *b* pendant une 1/2 heure à 62° et on essaye son pouvoir hémolytique vis-à-vis des érytrocytes d'oie.

Quantité de liquide.	*a*.	*b* 62°.
0,1	0	0
0,25	0	0
0,5	tr	0
0,75	pc	0
1,0	c	tr

Cette recherche montre que l'*émulsion ganglionnaire, maintenue pendant 3 heures à* 38°, *peut être encore inactivée.* Qu'advient-il plus tard?

Une nouvelle portion de la même émulsion séjourne 5 heures à 38°, et 15 heures à 8°; on procède comme dans l'expérience précédente et on porte *b* pendant 1/2 heure à 62°. On apprécie son pouvoir hémolytique vis-à-vis des globules rouges d'oie.

Quantité de liquide.	a.	b 62°.
0,1	0	0
0,25	0	0
0,5	par	0
0,75	pc	peu
1,0	c	c

On voit qu'après cet intervalle de temps, le chauffage ne fait qu'atténuer légèrement le pouvoir dissolvant de l'émulsion ganglionnaire.

b) *Extrait ganglionnaire.* — On prépare un extrait *rapide* (1/2 heure de séjour à la température de la chambre) à l'aide de ganglions mésentériques prélevés sur 10 cobayes. On répartit cet extrait en 4 portions (*a*, *b*, *c* et *d*). *a* est porté immédiatement à 55°,5 pendant 1/2 heure; *b*, *c* et *d* restent un temps variable à 38° et à la glacière. Ce temps une fois écoulé, on inactive ces extraits à 55°,5. On apprécie le pouvoir hémolytique vis-à-vis des globules rouges de lapins.

1 C. C. EXTRAIT + 1 GOUTTE SANG

Temps écoulé jusqu'au moment de l'inactivation	RÉSULTAT APRÈS									
	30'.		1 heure.		2 heures.		3 heures.		4 heures.	
	Non ch.	Ch.	Non ch.	Ch.	Non ch.	Ch.	Non ch.	Ch.	Non ch.	Ch.
0	0	0	0	0	tr-0	0	c	0	c	0
2 h. 30'	peu	0	c	0	c	0	c	par	c	par
10 h. [1]	c	0	c	peu	c	par	c	pc	c	pc
16 h. [2]	c	par	c	par	c	c	c	c	c	c

1. Cette série est restée, après l'inactivation, 10 heures à la température de la chambre, et a été ensuite placée à 38°.
2. Dont 10 heures à 38° et 6 heures à la température de la chambre.

Ces expériences montrent que *lorsqu'il s'agit de l'extrait* rapide *de ganglions de cobaye, extrait qui s'autolyse avec une extrême intensité, l'inactivation ne réussit qu'à la condition de faire intervenir la chaleur dans un délai qui ne dépasse pas 3 heures. Au delà de cette limite il devient impossible de détruire le pouvoir dissolvant de cet extrait, qui a eu aussi le temps de s'autolyser et d'engendrer des principes hémolytiques thermostabiles.* Si, dans le cas de l'*émulsion cellulaire*, ce délai est sensiblement plus long, cela tient au fait que, dans les liquides chargés de cellules, l'autolyse s'opère avec une certaine lenteur et, par suite, la formation de ces principes hémolytiques est plus tardive.

Nous avons essayé d'autre part d'isoler la *diastase autolysante* au moyen de la précipitation alcoolique ou de l'extraction par la glycérine.

Expérience X. — *La diastase autolysante des ganglions lymphatiques de cobaye.* — On prépare un extrait rapide à l'aide de ganglions mésentériques prélevés sur 9 cobayes. 14 c. c. de cet extrait sont traités avec 126 c. c. alcool absolu. Le précipité formé est recueilli, lavé, débarrassé de l'alcool, et repris par 10 c. c. d'eau salée isotonique. Après 20 heures de contact à 8°, on recueille le liquide surnageant *D*, et on soumet une partie de ce liquide à 70° pendant une 1/2 heure.

On prépare à ce moment un nouvel extrait ganglionnaire *G*; on porte une partie de cet extrait à 56° pendant 1/2 heure. L'expérience est disposée comme il suit (sang de lapin) :

a) *D* et *G* seuls, actifs et inactifs (56°)

Quantité de liquide.	*D* actif.	*D* 70°	*G* actif.	*G* 56°.
0,1	0	—	—	—
1,0	0	—	—	—
1,5	0	0	c	0

b) *D* actif + *G* inactif (56°)

D inactif (70°) + *G* inactif (56°)

D actif.	*D* 70°.	*G* 56°.	Résultat.
0,1	—	1 c. c.	0
0,5	—	1 c. c.	peu
1,0	—	1 c. c.	pc
1,5	—	1 c. c.	c
—	1,5	1 c. c.	0-tr

Ainsi, *la précipitation par l'alcool nous donne le moyen d'isoler, de l'extrait rapide de ganglions lymphatiques de cobaye, un principe diastasique qui ne jouit d'aucune action dissolvante vis-à-vis des érytrocytes de lapin, mais qui, ajouté à un extrait ganglionnaire*

préalablement inactivé, rend cet extrait hémolytique à l'égard de ces érytrocytes. Ce principe diastasique est *thermolabile*, puisque, porté à 70°, il perd ses propriétés réactivantes vis-à-vis des produits ganglionnaires.

Comment expliquer ce fait que la réunion de deux substances qui, prises chacune séparément, n'exercent aucune influence détériorante sur les globules rouges, constitue un mélange doué de proportions hémolysantes? Deux hypothèses s'offrent à l'esprit. En premier lieu on pourrait admettre qu'il s'agit ici d'un processus analogue à celui qui préside, suivant Bordet, à l'action des hémolysines spécifiques, où l'on voit la cytase et la sensibilisatrice, inactivées par elles-mêmes, se réunir et former une combinaison hémolysante. En second lieu, on pourrait supposer que la diastase ganglionnaire, mélangée à l'extrait macrophagique préalablement chauffé, provoque l'autolyse de cet extrait et aboutit à la genèse de corps hémolysants thermostabiles. Suivant la première de ces hypothèses, le mélange de diastase et d'extrait, considéré au moment où la dissolution des érytrocytes s'accomplit, doit perdre ses qualités hémolytiques sous l'influence de la chaleur. Par contre, d'après la seconde hypothèse, le chauffage appliqué au même moment ne doit avoir aucune prise sur le pouvoir dissolvant de ce mélange.

Nous avons soumis ces deux hypothèses au contrôle de l'expérience, en procédant de la façon suivante :

On place à 38°, en même temps que les tubes de l'expérience X, un mélange constitué par 1 c. c. 5 de diastase ganglionnaire active, et 1 c. c. d'extrait macrophagique inactivé. Au moment où l'hémolyse touche à sa fin dans les tubes témoins, on retire ce mélange et on le soumet pendant 1/2 heure à 56°. On essaye son pouvoir hémolysant à l'égard des érytrocytes de lapin.

Résultat : *Dissolution complète.*

Il s'ensuit que le principe qui, dans le mélange de diastase ganglionnaire et d'extrait macrophagique inactivé, provoque la dissolution de globules rouges, résiste, à l'encontre de la cytase, au chauffage prolongé à 56°. *Ceci vérifie entièrement l'hypothèse suivant laquelle cette diastase agit sur l'extrait ganglionnaire à l'instar d'une enzyme autolysante, pour aboutir à la formation de corps hémolytiques thermostabiles.*

Ces expériences prouvent qu'il est possible d'isoler la dias-

tase autolysante des ganglions lymphatiques de cobaye[1]. Quelle peut être la nature de cette diastase? On pourrait penser que l'enzyme autolytique ne soit autre que la cytase des sérums normaux, puisque d'une part, suivant les recherches de MM. Ehrlich et Morgenroth et de M. Bordet, cette cytase est à rapprocher des diastases protéolytiques[2], et que, d'autre part, les hémolysines des sérums perdent en général leur pouvoir dissolvant vers 56°. Cette hypothèse doit être écartée, comme le montre l'expérience suivante :

EXPÉRIENCE XI. — *La diastase autolysante n'est pas la cytase.* — On prépare un extrait rapide au moyen des ganglions mésentériques prélevés sur 5 cobayes, et on soumet cet extrait pendant 1/2 heure à 57°. On emploie d'autre part la cytase renfermée dans le sérum frais de cobaye neuf. Erytrocytes de lapin.

Extrait ganglionnaire 57°	Cytase de cobaye.	Extrait ganglionnaire actif.	Résultat.
0,1	0,1	—	peu
0,5	0,1	—	tr
0,75	0,1	—	0
1,0	0,1	—	0
1,5	0,1	—	0
1,0	—	—	0
—	0,1	—	peu
—	—	1,0	c

La même expérience répétée en ayant soin d'augmenter la quantité de cytase, aboutit à des résultats semblables.

Il nous semble que la *diastase autolysante des ganglions lymphatiques est sinon identique, du moins très étroitement liée aux enzymes protéolytiques, et en particulier à la trypsine.* On peut appuyer la vraisemblance d'une telle conception en premier lieu sur le fait que la trypsine inactive[3] du suc pancréatique de chien (fistule temporaire-sécrétine) devient hémolytique lorsqu'on le met en présence de l'extrait ganglionnaire, et que d'autre part, si on ajoute de la trypsine active (suc pancréatique

1. Le procédé d'extraction par la glycérine donne de moins bons résultats.
2. Suivant NOLFF (ces *Annales* 1901), la cytase des sérums hémolytiques ne jouit pas d'un vrai pouvoir protéolytique.
3. Suivant les constatations de MM. Delezenne et Frouin (*C. R. de la Soc. de Biologie*, 1902), et de Delezenne (*C. R.* de la même Société, 1903, février), le suc pancréatique de sécrétine et le suc pancréatique de fistule permanente obtenu par cathétérisme, sont dépourvus de pouvoir protéolytique et hémolytique.

de fistule permanente) à une émulsion macrophagique, on exagère sensiblement la formation des principes hémolytiques thermostabiles[1].

CONCLUSIONS

Les principes hémolysants thermostabiles contenus dans les extraits tardifs de ganglions lymphatiques résultent de l'autolyse qui s'opère au sein de ces extraits. Cette autolyse a lieu grâce à l'intervention d'une diastase élaborée par les cellules qui entrent dans la constitution de ces ganglions, les macrophages ou leucocytes mononucléaires, diastase qui est thermolabile, et que l'on doit séparer de la cytase et rapprocher des enzymes protéolytiques et lipolytiques. De l'action de cette diastase autolysante sur les albumines et sur les graisses naissent des produits de dissociation, acides amidés, acides gras et savons alcalins, auxquels on doit attribuer une partie, sinon la totalité, des propriétés hémolytiques thermostabiles des extraits macrophagiques.

III

PRÉSENCE DE LA CYTASE HÉMOLYTIQUE DANS LES EXTRAITS DE GANGLIONS LYMPHATIQUES

Les caractères essentiels de la cytase[2] hémolytique des sérums provenant d'animaux neufs peuvent être résumés de la manière suivante :

En premier lieu, cette cytase est capable, suivant l'espèce animale qui fournit le sérum, de dissoudre les érytrocytes d'une espèce étrangère. En second lieu, elle réactive un immun-sérum hémolytique préalablement chauffé à 56°. En troisième lieu, elle engendre, dans des conditions déterminées, une *anticytase* spécifique. Enfin, portée à 56° pendant 1/2 heure, elle perd, en général[3], son pouvoir hémolytique et réactivant.

Nous avons recherché, en tenant compte de ces caractères, si l'extrait rapide fait à l'aide de ganglions de cobaye renferme

1. Ces expériences ont été faites à l'aide de produits mis à notre disposition par M. Delezenne, Frouin et Pozerski; que ces messieurs reçoivent nos remerciements.

2. Le terme *cytase* est ici employé dans le sens générique du mot. Il ne présume rien quant à la *multiplicité* des cytases ou compléments hémolytiques contenus dans les sérums provenant d'animaux neufs.

3. Nous avons déjà vu que MM. Ehrlich et Morgenroth ont mentionné l'existence de cytases thermostabiles.

une substance que l'on pourrait rapprocher de la cytase des sérums. Il est entendu que pour trancher cette question, il ne suffit pas d'envisager exclusivement le pouvoir hémolytique de ces extraits et le fait que ce pouvoir disparaît sous l'influence de la chaleur. Nous avons vu, en effet, que, d'une part, les propriétés hémolysantes des extraits macrophagiques sont dues en grande partie à l'intervention des principes thermostabiles issus de l'autolyse, et que, d'autre part, l'action nocive des hautes températures s'explique par l'hypothèse de la diastase autolytique. Ce qu'il faut surtout étudier, c'est l'influence *réactivante* que les extraits de ganglions lymphatiques exercent soit à l'égard des érytrocytes préalablement chargés de sensibilisatrice, soit vis-à-vis d'un immun-sérum hémolytique.

EXPÉRIENCE XII. — *Présence de la cytase hémolytique dans l'émulsion cellulaire de ganglions lymphatiques de cobaye.* — On prépare une émulsion cellulaire à l'aide de ganglions mésentériques prélevés sur 5 cobayes. Après 2 heures de séjour à la température de la chambre, on porte une partie de cette émulsion à 55° pendant 1 h. 1/2. D'autre part, on sensibilise des érytrocytes de lapin au moyen d'une sensibilisatrice obtenue en injectant à des cobayes des globules rouges de lapin (dose dissolvante pour 1 goutte de sang, en présence de 0,2 cytase de lapin = 0,1 c. c.).

Quantité d'extrait.	EXTRAIT ACTIF						EXTRAIT 55°.	
	Glob. sensibilisés.			Glob. normaux.			Gl. sensib.	Gl norm.
	2 h.	3 h.	20 h.	2 h.	3 h.	20 h	20 h.	20 h.
0,1	0	0	tr	0	0	tr	0	0
0,5	tr	tr	c	0	0	bcp	0	0
0,75	pc	c	c	0	0	pc	0	0
1.0	c	c	c	0	c	c	0	0

EXPÉRIENCE XIII. — *Présence de la cytase hémolytique dans l'extrait de ganglions lymphatiques de cobaye* [1].

a) *Globules rouges sensibilisés.* — On prépare un extrait *rapide* à l'aide de ganglions mésentériques prélevés sur 5 cobayes ; on porte une partie de cet extrait à 55° pendant 1/2 heure. D'autre part, on sensibilise des globules

1. Cette expérience réussit infiniment mieux lorsqu'on se sert d'une sensibilisatrice fournie par le cobaye, que dans le cas où l'on emploie un immun-körper provenant de lapins immunisés.

rouges de lapin au moyen de la sensibilisatrice employée dans l'expérience XX.

Extrait gangl. non chauffé.	Extrait gangl. 56°.	GLOBULES SENSIB.		GLOBULES SENSIB.	
		1 h.	20 h.	1 h.	20 h.
0,1	—	0	0	—	—
0,5	—	peu	par	—	—
1,0	—	pc	c	—	—
1,5	—	c	c	—	—
—	1,5	0	0-tr	—	—
1,5	—	—	—	0	par
—	1,5	—	—	0	0

b) *Réactivation de la sensibilisatrice.* — On emploie 2 extraits macrophagiques de cobaye, *a* et *b*. Le premier a été préparé immédiatement après l'extirpation des ganglions lymphatiques; le second a été obtenu après un séjour de l'émulsion cellulaire pendant 3 heures à 38°. On se sert de la sensibilisatrice utilisée dans l'expérience XII.

1) EXTRAIT GANGLIONNAIRE IMMÉDIAT (*a*)

Extrait gangl. actif	Extrait gangl. 55°.	Sensibilisatrice	Sérum de cobaye 56°.	RÉSULTAT APRÈS	
				3 h. à 38°.	20 h. à 8°.
0,1	—	0,1	—	0	0
0,3	—	0,1	—	peu	peu
0,75	—	0,1	—	bcp	pc
0,1	—	—	0,1	0	0
0,3	—	—	0,1	0	0
0,75	—	—	0,1	0	0
—	0,75	0,1	—	0	0
—	0,75	—	0,1	0	0

L'extrait ganglionnaire tardif (*b*) a donné les mêmes résultats.

Ces expériences montrent que *l'extrait rapide ou l'émulsion cellulaire des ganglions lymphatiques de cobaye hémolysent plus promptement les érytrocytes chargés de sensibilisatrice que les globules rouges dépourvus de cette sensibilisatrice, et que, d'autre part, ce pouvoir hémolytique est détruit par le chauffage à 56°.* On voit également que *les mêmes produits macrophagiques réactivent aisément l'immun-sérum fourni par les cobayes qui reçoivent en injection sous-cutanée des globules rouges de lapin.* Ce sont là des faits qui prouvent suffisamment l'existence de la cytase hémolysante dans les ganglions lymphatiques de cobaye.

On pourrait pourtant objecter que le pouvoir réactivant de ces extraits, loin d'être attribuable à la vraie cytase, est dû en réalité à l'intervention des principes hémolytiques thermostabiles, d'origine autolytique. Les recherches suivantes permettent d'écarter entièrement cette objection.

EXPÉRIENCE XIV. — *Le pouvoir réactivant des extraits macrophagiques n'est pas dû à l'intervention des substances hémolytiques thermostabiles.*

a) On détermine la quantité minima de sérum de cobaye neuf, préalablement inactivé à 56°, qui entrave l'action dissolvante exercée par 1 c. c. d'extrait ganglionnaire sur une goutte de sang de lapin. Le pouvoir hémolysant de cet extrait a été apprécié après un temps variable de séjour à 38° et 8°.

Temps de séjour de l'extrait à 38° et à 8°.	RÉSULTAT APRÈS							
	1 heure.		2 heures.		3 heures.		4 heures.	
	Extrait seul.	Extrait + 0,3 sérum.	Extrait seul.	Extrait + 0,3 sérum.	Extrait seul.	Extrait + 0,3 sérum.	Extrait seul.	Extrait + 0,3 sérum.
0	0	0	0	0	tr	0	c	0
2 h. 30′	peu	0	c	0	c	0	c	0
10 h.	c	0	c	0	c	0	c	0
16 h. [1]	c	0	c	0	c	0	c	0

1. Dont 10 heures à 38° et 6 heures à la température de la chambre.

Il résulte que 0,3 de cobaye neuf, préalablement inactivé à 56°, neutralise complètement 1 c. c. d'extrait ganglionnaire, quel que soit le temps pendant lequel cet extrait a séjourné à 38° ou à la glacière.

b) Dans la seconde partie de l'expérience on essaye le *pouvoir réactivant* du même extrait macrophagique *vis-à-vis de* 0,03 *c.c. de sensibilisatrice hémolytique* [1]. Même disposition que dans la recherche précédente. On maintient une partie de l'extrait pendant une demi-heure à 56°.

Temps de séjour de l'extrait à 38° et à 8°.	RÉSULTAT APRÈS									
	30′.		1 h.		2 h.		3 h.		4 h.	
	Actif.	56°.	Actif.	56°.	Actif.	56°.	Actif.	56°.	Actif.	56°.
0	pc	0	pc	0	pc	0	pc	0	pc	0
2 h. 30′	pc	0	pc	0	pc	0	pc	0	pc	0
10 h.	0	0	peu	0	peu	0	par	0	par	0
16 h.	0	0	tr	0	tr	0	tr	0	tr	0

1. On se sert de la sensibilisatrice employée dans l'expérience XX.

Il découle de cette expérience que 1 c. c. d'extrait rapide de ganglions de cobaye réactive presque entièrement 0,3 c. c. de sensibilisatrice. Or, à cette dose, le sérum normal, et par conséquent aussi le sérum qui renferme cette sensibilisatrice, entravent complètement l'action dissolvante des hémolysines thermostabiles contenues dans 1 c. c. de cet extrait. Ceci démontre d'une manière non douteuse que *les propriétés réactivantes de l'extrait rapide de macrophages sont véritablement dues à la cytase, et non pas aux principes hémolysants thermostabiles issus de l'autolyse.*

D'ailleurs, il suffit de comparer les résultats fournis par l'expérience XIV (*b*), à ceux qui découlent de la recherche IX (*b*), pour se persuader qu'une opposition des plus frappantes existe entre la cytase ganglionnaire et les substances hémolytiques thermostabiles des extraits macrophagiques. Tandis que la première s'atténue sensiblement pendant son séjour à 38°, au point de devenir incapable de réactiver la sensibilisatrice, les secondes se développent de plus en plus dans ces conditions, pour atteindre leur maximum d'action vers la fin de l'expérience.

On peut donc conclure de l'ensemble de ces recherches que les propriétés hémolytiques et réactivantes des extraits macrophagiques témoignent d'un processus assez complexe. D'une part, ces extraits sont le siège de phénomènes d'autolyse qui aboutissent à la formation d'hémolysines thermostabiles; d'autre part, il apparaît clairement qu'en dehors de ces hémolysines d'origine autolytique, ces extraits renferment une cytase identique à celle du sérum, puisqu'elle est capable de réactiver une sensibilisatrice spécifique. Si l'on ajoute le fait que, dans des conditions déterminées[1], on peut, en injectant à des lapins des extraits ganglionnaires de cobaye, engendrer une *anticytase*[2], on se convaincre plus encore de la présence de cette cytase dans les produits macrophagiques.

*
* *

Plusieurs recherches que nous avons entreprises dans le but

1. Le résultat fourni par nos recherches a été manifestement positif, quoique le pouvoir anticytasique du sérum des animaux qui recevaient, en injection intrapéritonéale, des extraits ganglionnaires, fût loin d'égaler celui des vrais sérums anticomplémentaires. Néanmoins, ces recherches n'en sont pas moins probantes puisque d'autres auteurs, en particulier Wassermann (*Ztf. für Hyg.*, 1901, juin), Donath et Landsteiner (*Wien. kl. Woch.* 1901, juillet) et Ascoli (*Munch. med. Woch.* 1901, n° 34), dans des expériences entreprises dans une même direction, ont été plus heureux que nous.

2. L'action de cette anticytase a été éprouvée soit vis-à-vis du sérum de cobaye seul, soit en présence d'une sensibilisatrice.

de préciser si les extraits de ganglions lymphatiques renferment, en dehors de la cytase hémolytique, *une alexine capable de réactiver la sensibilisatrice bactériolytique*, nous ont conduit à des résultats qui méritent d'être signalés.

EXPÉRIENCE XV. — *Présence de la cytase bactériolytique dans l'extrait rapide de ganglions lymphatiques de cobaye.* On se sert d'un extrait rapide de ganglions mésentériques de cobaye; une partie de cet extrait est maintenu pendant une demi-heure à 56°. D'autre part, on emploie un immun-sérum anti-cholérique, fourni par un lapin auquel on a injecté plusieurs fois de suite des cultures tirées de *Vibrio Cassino*.

Extrait gangl. actif.	Extrait gangl. 56°.	Cytase de cobaye.	Sensibilisatrice.	Nombre des colonies.
0,1	—	—	0,3	1197
0,5	—	—	0,3	756
0,75	—	—	0,3	260
1,0	—	—	0,3	102
1,5	—	—	0,3	0
—	1,5	—	0,3	800
—	—	0,05	0,3	0
—	—	0,1	0,3	0
—	—	0,25	0,3	0
—	—	0,4	0,3	0
—	—	0,5	0,3	0
—	—	—	0,3	630
1,0	—	—	—	6804
—	0,5	—	—	504
0	0	0	0	∞

Cette expérience, répétée plusieurs fois, montre que *l'extrait de macrophages renferme une cytase bactériolytique capable de réactiver l'immun-sérum anti-cholérique.* Néanmoins le pouvoir réactivant de cette cytase est sensiblement *inférieur* à celui que l'on enregistre lorsqu'on s'adresse à une sensibilisatrice hémolytique. Plus encore, il suffit de comparer l'action bactéricide de l'extrait ganglionnaire seul à la bactériolyse exercée par une dilution de sérum frais, pour se convaincre du fait que cette action est de beaucoup inférieure à celle de ce sérum. *Les propriétés hémolysantes des macrophages, envisagées comme un résultat de l'intervention des principes autolytiques thermostabiles et de la cytase, sont sensiblement plus accentuées que les fonctions bactériolytiques de ces cellules.*

Cette conclusion, qui découle d'un ensemble de faits observés *in vitro*, confirme pleinement les constatations de Metchnikoff et

de ses élèves concernant le rôle de ces macrophages dans le conflit qui a lieu entre l'organisme vivant et les éléments étrangers, microbes ou cellules. Il est actuellement hors de doute que chaque fois que l'on introduit dans un organisme quelconque des éléments cellulaires, érytrocytes, spermatozoïdes ou épithéliums vibratiles, provenant d'une espèce étrangère, ce sont ces macrophages qui se chargent de l'englobement et de la digestion de ces éléments. Dans un travail. publié dans ces *Annales*, nous avons eu déjà l'occasion d'insister sur ce fait; nous avons alors démontré que l'injection d'une hémolysine spécifique dans la cavité péritonéale des cobayes exagère au plus haut point l'érytrophagocytose dans la rate, et que, dans ce cas, il est possible de déceler dans la circulation générale des macrophages renfermant quantité de globules rouges. Or, dans toutes ces expériences, et encore plus quand on s'adresse à des animaux normaux, le rôle joué par les polynucléaires est de beaucoup inférieur à celui des macrophages. Par contre, dans la lutte que l'organisme animal entreprend contre les microbes pathogènes, sauf de rares exceptions (tuberculose, etc.,) ce sont ces leucocytes polynucléaires qui entrent en ligne, pour englober ces microbes et les détruire au sein de leur protoplasma. On n'est donc guère surpris quand on voit que dans les recherches faites *in vitro*, le pouvoir cytolytique des globules blancs mononucléaires apparaît d'une manière aussi frappante.

IV

Étude parallèle des leucocytes polynucléaires et des macrophages, au point de vue de leurs propriétés bactériolytiques et cytolytiques.

Les observations exposées jusqu'ici se rapportent exclusivement aux leucocytes mononucléaires, puisqu'elles ont été recueillies en expérimentant sur les ganglions lymphatiques, source principale, si non unique, de ces leucocytes. Il était indiqué de rechercher quelles sont, au point de vue hémolytique et bactériolytique, les propriétés des globules blancs polynucléaires, et si l'on ne pourrait pas saisir une certaine différence entre ces deux ordres de leucocytes. On sait, depuis les constatations déjà anciennes de Shattenfroh, confirmées maintes fois depuis, que les extraits de globules blancs polynucléaires sont entièrement

dépourvus de qualités hémolysantes. Voici une expérience qui vérifie pleinement cette assertion :

EXPÉRIENCE XVI. — *L'extrait de leucocytes polynucléaires est dépourvu de propriétés hémolytiques.* Deux cobayes reçoivent dans la cavité péritonéale 4 c. c. d'une émulsion épaisse de levure de bière, préalablement lavée et maintenue pendant 3/4 d'heure à 56°. On sacrifie les animaux 18 heures après l'injection et on recueille l'exsudat péritonéal, riche en polynucléaires. On sépare les cellules au moyen de la force centrifuge, on les lave et on les suspend dans 8 c. c. d'eau salée isotonique. Après 20 heures de contact à la température de la chambre, on obtient un liquide clair, dont on soumet une partie à 56° pendant 3/4 d'heure. On essaye le pouvoir hémolytique de cet extrait vis-à-vis des érytrocytes de lapin. Cytase de cobaye.

Extrait actif.	Extrait 56°.	Résultat
0,1	—	0
1,0	—	0
1,5	—	0
2,0	—	0
—	1,5	0

L'absence de toute trace de propriété hémolytique dans les extraits de leucocytes polynucléaires peut s'expliquer de deux manières. D'une part, on peut supposer que ces leucocytes, à l'encontre des macrophages, sont dépourvus de cytase hémolytique; d'autre part, il est possible que les polynucléaires n'élaborent pas la *diastase autolysante* que nous avons mise en évidence chez les mononucléaires et qu'ils soient, pour cela, incapables de s'autolyser et d'engendrer des produits hémolysants thermostabiles. Nous avons soumis cette dernière interprétation au contrôle de l'expérience, et nous avons recherché si les extraits de leucocytes polynucléaires renferment un principe diastasique pouvant réactiver un extrait ganglionnaire, préalablement chauffé à 56°. Voici une expérience qui a trait à cette question.

EXPÉRIENCE XVII. — *Les leucocytes polynucléaires ne renferment pas de diastase autolysante.* Quatre cobayes reçoivent dans la cavité péritonéale 10 c. c. d'une émulsion d'aleurone. On sacrifie les animaux 18 heures après l'injection et on recueille l'exsudat péritonéal, riche en polynucléaires. Les leucocytes isolés au moyen de la force centrifuge, servent à la préparation d'un extrait rapide *P* (1 h. 1/2 de séjour à la température du laboratoire).

D'autre part, on prépare un extrait rapide de ganglions lymphatiques prélevés sur les mêmes animaux (*M*). On inactive une partie de cet extrait à 56°. Erytrocytes de lapin.

P.	*M* 56°.	*M* actif.	Résultat.
0,1	1.0	—	0
0,5	1.0	—	0
1,0	1,0	—	0
1.5	1.0	—	0
2,0	1.0	—	0
—	1,5	—	0
—	—	1,5	c

L'extrait préparé à l'aide de leucocytes polynucléaires est donc non seulement dépourvu de propriétés hémolysantes, mais encore incapable de rendre hémolytique un extrait macrophagique préalablement inactivé à 56°. Il y a donc là une différence frappante entre les microphages et les macrophages, ces derniers, comme nous l'avons déjà établi, possèdent une diastase autolytique qui réactive cet extrait macrophagique. Cette différence persiste, quoique à un degré plus faible, entre les *propriétés bactériolytiques* des extraits.

EXPÉRIENCE XVIII. — *Pouvoir hémolytique et bactériolytique des extraits de leucocytes polynucléaires et mononucléaires.* Huit cobayes reçoivent dans la cavité péritonéale 10 c. c. d'une émulsion épaisse de levure, préalablement lavée. On sacrifie les animaux 20 heures après l'injection et on recueille l'exsudat péritonéal, riche en leucocytes polynucléaires. On prépare à l'aide de ces leucocytes un extrait rapide *D* (1 h. 1/2 de contact à la température du laboratoire). On emploie d'autre part un extrait rapide de ganglions mésentériques, que l'on inactive à 56° (*M*).

a) HÉMOLYSE (ÉRYTROCYTES DE LAPIN)

P.	*M* actif.	*M* 56°.	RÉSULTAT APRÈS 2 h.	3 h.	20 h.
1,5	—	—	0	0	0
—	1,5	—	c	c	c
—	—	1,5	0	0	0
0,1	—	1,0	0	0	0
0,5	—	1,0	0	0	0
1,0	—	1,0	0	0	0
0,5	1,5	—	0	0	c

b) BACTÉRIOLYSE

On se sert d'une sensibilisatrice anticholérique fournie par un mouton qui a reçu plusieurs injections de cultures mortes et vivantes de vibrion du Caire. On étudie le phénomène de Pfeiffer, *in vitro*. On ajoute dans chaque tube une goutte d'une émulsion vibrionienne, pour 2 c. c. de liquide. On se sert comme témoin de la cytase de cobaye.

Sensibilisatrice.	Quantité d'extraits de cytase.	Résultat après 1 h. 1/2 de séjour à 38°.				
		P		*M*		Cytase.
5 gouttes	0,05	peu de granulations	aggl. forte	pas de granulations		—
5 gouttes	0,1	transf. granulaire partielle	aggl. forte	peu de gran.	forte agglutination	—
5 gouttes	0,5	transf. granulaire complète	peu d'amas.	transform. granulaire partielle		—
5 gouttes	1,0	idem	0. agglut.	transf. gran. partielle		—
0	0,25	—	—	—		transf. gran. presque complète

Cette expérience, confirmant les recherches précédentes, montre que *l'extrait de globules blancs polynucléaires est entièrement dépourvu de propriétés dissolvantes à l'égard des globules rouges. Elle prouve, d'autre part, que les qualités bactériolytiques de cet extrait sont sensiblement plus accentuées que celles de l'extrait macrophagique.* Cela démontre suffisamment l'opposition qu'il y a lieu d'établir entre les deux ordres de globules blancs étudiés, globules qui jouissent d'un pouvoir microbicide inégal, et qui se comportent si différemment au point de vue hémolytique.

Mais cette opposition entre ces deux catégories leucocytaires ne se borne pas là. Il nous a été, en effet, possible de constater que *les exsudats riches en polynucléaires, loin de favoriser le pouvoir hémolysant des produits macrophagiques, exercent vis-à-vis de ces produits une action empêchante des plus manifestes.*

EXPÉRIENCE XIX. — *Action empêchante de l'exsudat péritonéal riche en polynucléaires (précipité alcoolique) vis-à-vis des hémolysines thermostabiles des ganglions lymphatiques.* Huit cobayes reçoivent dans la cavité péritonéale 10 c. c. d'une émulsion épaisse d'aleurone. On sacrifie les animaux 18 heures après l'injection et on introduit dans le péritoine de chaque cobaye 2 c. c.

d'eau salée isotonique. On recueille ainsi 18 c. c. d'exsudat riche en polynucléaires, que l'on soumet à la force centrifuge, après 2 heures de séjour à la température du laboratoire. On obtient 14 c. c. d'un liquide clair, que l'on traite avec 9 volumes d'alcool absolu. Le précipité est recueilli, débarrassé de l'alcool, et suspendu dans 15 c. c. d'eau salée. Après 20 heures de contact à 8°, on centrifuge de nouveau, et on essaye le pouvoir empêchant de l'extrait ainsi préparé, vis-à-vis de l'hémolyse produite par un extrait ganglionnaire rapide.

Extrait ganglionnaire.	Extrait de polynucléaires.	Résultat.
1,0	—	c
—	2,0	0
1 c. c.	0,1	c
1 c. c.	0,5	tr
1 c. c.	1,0	0
1 c. c.	1,5	0
1 c. c.	2,0	0

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Il résulte de l'ensemble de ces recherches que l'on ne saurait pas identifier, au point de vue bactériolytique et surtout hémolytique, les deux catégories de leucocytes étudiés. Tandis que les macrophages des ganglions lymphatiques, grâce à leur faculté autolytique et à la cytase contenue dans ces ganglions, apparaissent comme une source importante d'hémolysines, les polynucléaires puisés dans l'exsudat péritonéal sont dépourvus de toute trace de propriétés hémolytiques, appréciables in vitro. *Il en est de même, quoique à un plus faible degré, des qualités bactéricides de ces espèces leucocytaires. Ce sont les polynucléaires qui, à ce point de vue, jouent le rôle principal, tandis que les macrophages, sans être exempts de principes capables de réactiver une sensibilisatrice bactériolytique, en sont moins riches que les polynucléaires.*

Sur la flore microbienne thermophile

DU CANAL INTESTINAL DE L'HOMME.

Par Mlle TSIKLINSKY

Moscou, Institut bactériologique de l'Université.

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

L'étude de la flore microbienne du canal intestinal de l'homme a pris, dans ces derniers temps, une importance considérable. Aussi ai-je accepté avec un vif plaisir la proposition qui m'a été faite par mon maître, M. Metchnikoff, qui a réveillé cette question d'étudier les microbes « thermophiles » du canal intestinal de l'homme. Cette étude se rattachait intimement à mes travaux précédents[1], consacrés au phénomène de la thermobiose.

Mes recherches se divisent en deux parties : la première contient les expériences faites sur le méconium et les fèces des nourrissons; la seconde, les expériences qui ont été faites sur les fèces des adultes.

Le premier travail important sur ce point revient à M. Escherich[2]. D'après ce savant, déjà quelques heures après la naissance de l'enfant, les microbes apparaissent dans son canal intestinal, introduits probablement par la bouche, ou par l'anus. La constitution de la flore du méconium est tout à fait accidentelle et offre un aspect très bizarre. A partir du 4e ou du 5e jour, une flore des fèces s'établit pour rester ensuite invariable pendant tout le temps que l'enfant est au sein. Cette flore se distingue alors par une grande uniformité et par une stabilité étonnantes. Deux espèces de bacilles prédominent : le *bac. coli communis* et le *bac. lactis aërogenes :* outre ces deux bacilles, on observe généralement un petit nombre de coccus, de bacilles.

1. Sur les mucédinées thermophiles, *An. de l'Institut Pasteur*, 1899, vol. 13.
Sur les microbes thermophiles des sources thermales, *An. de l'Institut Pasteur* 1899, p. 788.

2. Escherich, *Die Darmtacterien des Sauglings*, 1886.

Ces bactéries, se présentent toutes, surtout le *bac. coli communis et le bac. lactis aerogenes*, comme des agents de fermentation lactique. Par contre, elles n'agissent que très faiblement sur les matières albuminoïdes (caséine).

Les recherches de M. Escherich ont été complétées par d'autres travaux, par le mémoire si intéressant, récemment publié par M. Tissier [1].

Le microbe qui prédomine dans les fèces des nourrissons est, selon Tissier, un bacille particulier, le *bac. bifidus* : c'est un anaérobie obligatoire, et si M. Escherich n'a pas réussi à l'isoler en culture pure, c'est probablement par suite de l'imperfection des méthodes dont il s'est servi.

A part le *bac. bifidus*, Tissier a isolé des fèces des nourrissons les *bac. coli communis, bac. lactis aerogenes* et *streptococcus intestinalis* : la part que toutes ces bactéries prennent dans la digestion de l'enfant est insignifiante. D'après une communication verbale, M. Tissier estime que le rôle du *bac. bifidus*, ainsi que des trois autres espèces les plus fréquentes dans le canal intestinal des enfants, est de protéger leur organisme contre l'invasion des microbes étrangers nuisibles, comme, par exemple, des microbes de putréfaction.

Comme matières pour mes recherches, j'ai eu à ma disposition 20 échantillons de méconium et de fèces d'enfants (entre le 1er et le 8e jour après la naissance) provenant de la Maison d'accouchement de Moscou [2]. J'ai étudié 18 autres cas à Paris. Ces derniers 18 cas ont été observés, suivant le conseil de M. Metchnikoff, dans le but de savoir si la flore intestinale des enfants change, ou non, sous l'influence des conditions climatériques.

Bien que l'objet direct de mes recherches fût l'étude des *microbes thermophiles* des fèces d'enfants, j'ai néanmoins considéré comme utile, pour m'orienter mieux, de commencer par l'étude du tableau microscopique général, que présentent les fèces d'enfants. L'opinion que je me suis faite est en accord général

1. Tissier. *Recherches sur la flore intestinale du nourrisson*, 1900.

2. Les matières pour ces recherches m'ont été obligeamment procurées par le Dr Vlassievsky, auquel j'adresse ici mes remerciements.

Les enfants de Paris (âgés également de 1 à 8 jours) appartenaient à la Maison d'accouchement de Baudelocque. — C'est sur des enfants sains que les recherches ont été faites, dans les deux séries d'expériences.

avec les données d'Escherich et de Tissier. J'ai observé, en effet, l'infection du méconium 8 ou 10 heures après la naissance de l'enfant; puis l'élévation graduelle de cette infection les 4 premiers jours, et enfin, l'établissement de la flore uniforme dans les jours suivants. Dans les fèces des enfants de Moscou, tout aussi bien que chez les enfants de Paris, c'est invariablement le *bac. bifidus* qui prédomine, à un si haut degré, qu'un frottis de fèces depuis le 5e ou le 6e jour, jusqu'au jour où l'enfant est nourri au sein, présente, pour ainsi dire, une culture pure de *bac. bifidus*. Le *bac. coli communis* et le *bac. lactis aërogenes* ne s'observent qu'en quantité peu considérable.

Mais c'est surtout dans les fèces des enfants de Paris que j'ai observé le tableau si typique, qui concorde complètement avec la description donnée par M. Tissier. A Moscou la concordance était moins rigoureuse; il est vrai qu'à partir du 4e ou du 5e jour, c'est le *b. bifidus* qui prédominait : mais, à côté de ces cas typiques, nous avons pu en constater d'autres où, outre le *bac. bifidus*, l'on observait la présence de beaucoup d'autres microbes; des coccus gros et petits, isolés et réunis par deux, ainsi que différents bacilles, ne ressemblant pas au *bac. bifidus*. On doit peut-être mettre cela au compte de la différence dans les soins de propreté donnés aux enfants.

Pour ce qui est du méconium, on n'a pas pu constater l'identité complète entre les tableaux microscopiques de Paris et ceux de Moscou. J'ajouterai seulement que, dans la plupart des cas, conformément à la description donnée par M. Escherich, on a trouvé dans le méconium de l'une et de l'autre provenance le *bac. de Bienstock*, un grêle bâtonnet, portant une spore ronde à l'une de ses extrémités et un bacille, portant une spore en son milieu.

Cela posé, voici la méthode dont je me suis servie pour isoler en culture pure les microbes thermophiles. J'ensemençais les matières fécales, prises aseptiquement (avec 2-3 anses de platine par tube) dans des tubes contenant différents milieux nutritifs : la gélose ordinaire, glycérinée et sucrée; le bouillon ordinaire et additionné de lait, le lait, la pomme de terre, le sérum coagulé. Dès qu'on observait une multiplication, on faisait des plaques de gélose, et des colonies obtenues on isolait des cultures pures des microbes. Afin d'être certaine de la pureté des cultures, je faisais ordinairement à plusieurs

reprises des plaques de chaque espèce de colonie obtenue.

Je tiens à noter qu'en coulant des plaques de microbes thermophiles, je me suis heurtée quelquefois à des difficultés inattendues : souvent je n'obtenais sur les plaques aucune croissance, même à une faible dilution; quelquefois, au contraire, j'observais une croissance uniforme confluente où il était impossible de distinguer des colonies.

Je ne parvenais pas toujours à éviter ces derniers inconvénients, même en faisant une forte dilution et en prenant des précautions contre l'influence fâcheuse de l'eau éliminée par la gélose, qui, en se répandant sur la surface du milieu nutritif pouvait favoriser le fusionnement confluant des colonies. Pour y remédier, après avoir ensemencé et dès que la gélose était prise, je retournais les plaques de telle façon que le couvercle fût en dessous. Il faut noter que, dans certains cas, on obtenait des colonies très nettes et parfaitement séparées, bien que l'ensemencement en plaques ait été fait exactement de la même façon que dans les cas moins favorisés.

Chaque fois, avant de faire des cultures en plaques, on observait le contenu des tubes au microscope.

On y constatait une véritable richesse de formes bactériennes ; mais nous n'insistons pas sur ces difficultés qu'ont rencontrées tous ceux qui ont fait des recherches de cet ordre à propos des bacilles non thermophiles.

En tout, de la matière examinée (20 prises chez les nourissons à Moscou et 18 à Paris et 8 prises chez des adultes), j'ai pu isoler en culture pure 20 espèces de microbes thermophiles, à la description desquelles je passe maintenant.

LES MICROBES THERMOPHILES ISOLÉS DU MÉCONIUM ET DES FÈCES DES NOURRISSONS A MOSCOU.

BACILLE N° 1.

Ce bacille fut isolé chez un enfant âgé de 2 jours. Il ne fut rencontré qu'une seule fois.

C'est un bâtonnet immobile se disposant souvent par deux, parfois par 4 articles et plus, aux bouts arrondis, quelquefois renflés. Ils se colorent par les couleurs d'aniline et par le Gram; mais ils prennent les couleurs d'une façon très inégale; à côté de bâtonnets fortement colorés, il y en a d'autres plus pâles : dans des chaînes de 4 et de 6 individus, 2 sont très bien colorés et les autres tout à fait incolorés (fig. n° 1). On observe aussi des individus n'ayant

qu'aux pôles des grains colorés. Il pousse dans du bouillon sous la forme de petits flocons, qui dans des cultures anciennes tombent au fond du tube. Il forme un peu d'acide dans du bouillon sucré. Sur la gélose ordinaire il donne le long de la strie un enduit blanc, épais, opaque, avec des bords irréguliers nettement délimités ; il ne couvre jamais toute la surface de la gélose et forme ordinairement, à côté de la strie, plusieurs grandes colonies isolées; sur la gélose sucrée, sa végétation est un peu plus faible, et le plus souvent

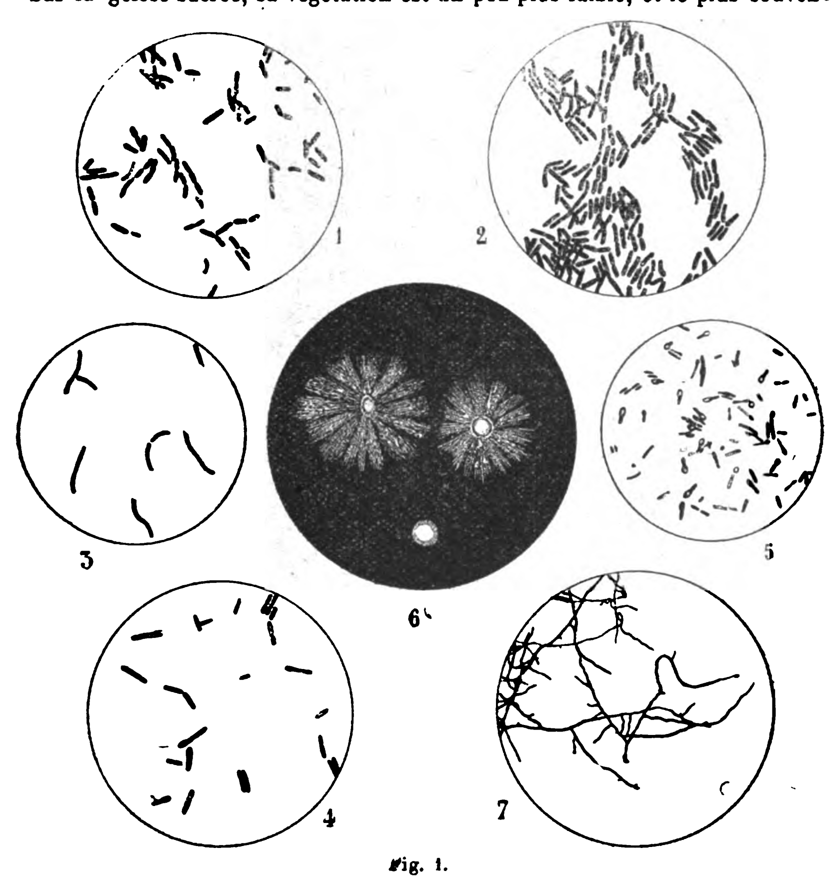


Fig. 1.

en forme de colonies isolées. Il ne pousse pas du tout sur la pomme de terre; ne coagule pas le lait et ne liquéfie pas la gélatine. La colonie de ce bacille est blanche, ronde, d'une structure ondulante; à l'examen microscopique à un faible grossissement, on voit aux bords des bacilles, qui dépassent — une sorte de cils. Les colonies très jeunes sont bleuâtres. L'optimum de la croissance est de 56° 1/2 à 57°; à 64°, il se développe encore faiblement; à 67°, il n'y a que des traces de croissance. C'est un aérobie et un thermophile absolu.

Il n'est pas pathogène.

BACILLE N° 2.

Nous l'avons rencontré une fois, dans les selles d'un enfant âgé de 6 jours.

C'est un bâtonnet immobile assez épais, se disposant pour la plupart du temps par deux, avec des bouts arrondis, parfois renflés; quelques individus s'étendent en longs filaments. Sur la gélose il pousse toujours sous forme de colonies isolées, qui, jeunes, sont bleuâtres et transparentes; dans des cultures âgées de quelques jours, elles se présentent denses et d'une couleur blanche.

Ce bacille végète faiblement dans du bouillon sans le troubler et en formant un petit dépôt au fond du tube. Dans du bouillon sucré, il donne une petite quantité d'acide. Sur la gélose sucrée, il croît de la même façon que sur la gélose ordinaire; il ne coagule pas le lait, ne liquéfie pas la gélatine. Ce qu'il y a de très caractéristique chez ce bâtonnet, ce sont les colonies, qui ont la forme d'anneaux; elles sont rondes, avec des bords nettement délimités, saillants et épais. Il se colore par toutes les couleurs d'aniline, prend le Gram et se comporte vis-à-vis des couleurs comme le bacille précédent. L'optimum de croissance est à 56°-57°. Il pousse bien à 60°; à 62°, il ne donne que des traces de croissance; à 37°, il pousse aussi, mais très lentement : les premiers indices de croissance apparaissent au bout de 2 à 3 jours. A cette dernière température, il forme des spores excentriquement disposées, et le type de cette spore est le vrai « clostridium ».

C'est un thermophile facultatif. Il n'est pas pathogène.

BACILLE N° 3.

Il fut isolé d'un enfant âgé de 16 heures; rencontré deux fois dans le méconium.

C'est un bâtonnet immobile se disposant isolément; à côté d'individus droits, on voit des formes recourbées (fig. n° 3), et quelquefois même très fortement. Les bâtonnets diffèrent entre eux, en largeur et en longueur; certains sont 4 à 5 fois plus longs que larges.

Les spores sont disposées aux bouts. Ce bacille donne facilement des formes d'involution. Il se colore bien par les couleurs d'aniline et prend le Gram; la manière dont il prend les couleurs est la même que chez les précédents : à côté de bâtonnets fortement colorés, il y en a d'incolores. En employant la méthode de Gram, on voit beaucoup de bâtonnets qui restent incolores, tandis qu'ils peuvent se colorer ensuite par des couleurs ordinaires; par exemple, par la fuchsine aqueuse ou Ziel dilué, de sorte que, dans la même préparation, on voit à côté de bâtonnets bleu foncé (Gram) des groupes entiers de bâtonnets roses. Ce fait s'observe même dans des cultures très jeunes, âgées de 20 heures. Les colonies de ce bâtonnet sont rondes, homogènes, légèrement translucides, avec un centre épais et des bords à double contour. Il pousse un peu plus faiblement sur la gélose sucrée. Dans du bouillon, il forme une espèce de pellicule glaireuse; cette pellicule tombe au fond du tube dans des cultures âgées de quelques jours. Dans la gélatine, il pousse sous forme de flocons avec une pellicule friable à la surface. Il

pousse abondamment sur le sérum coagulé sans présenter aucun caractère typique. Sur la pomme de terre, il ne donne pas de culture. Il produit de l'acide dans le bouillon sucré; la réaction de l'indol donne des résultats négatifs; il ne coagule pas le lait, ne liquéfie pas la gélatine. L'optimum de croissance est à 57°. A 58° et 65°, il pousse bien; à 67°, des traces de croissance; à 37°, il n'accuse pas de croissance au bout de 8 jours; si on le transporte ensuite à sa température optimum, il se développe abondamment au bout de 24 heures. Il n'est pas pathogène.

BACILLE N° 4.

Ce bacille fut isolé d'un enfant âgé de 5 jours.

Il ne fut rencontré qu'une seule fois.

C'est un bâtonnet épais à bords arrondis; se disposant par deux et plusieurs individus, et presque jamais isolément. Ajoutons que les bacilles se disposent en rangées parallèles, et présentent généralement un tableau assez caractéristique (fig. n° 2). Ils se colorent bien par toutes les couleurs d'aniline et par le Gram; le mode de coloration est le même que chez les microbes précédents. On n'a pas observé de spores. Il pousse abondamment sur tous les milieux nutritifs, sauf la pomme de terre. La croissance sur le sérum coagulé est bien caractéristique : elle prend la forme de grosses colonies, saillantes, rappelant celles que l'on obtient par l'ensemencement des fausses membranes diphtériques. Dans le bouillon et sur la gélatine, il pousse sous forme de flocons, il produit un peu d'acide dans du bouillon sucré, ne forme pas d'indol, ne liquéfie pas la gélatine. Sur la gélose ordinaire il donne naissance à des colonies homogènes, épaisses au centre. Les colonies sur du sérum coagulé prennent quelquefois la forme d'un anneau, comme celles du bacille n° 2. L'optimum de sa croissance est 57°; à 64°, il donne encore une végétation sensible; à 66°, des traces de croissance; il ne se développe pas à 37°. C'est un aérobie absolu; il n'est pas pathogène.

BACILLE N° 5.

Il fut isolé d'un enfant âgé de 4 jours, et ne fut trouvé qu'une seule fois.

C'est un court et mince bâtonnet, se disposant d'ordinaire isolément; il ne forme pas de spores. Il se colore bien par les couleurs d'aniline et par le Gram; la plupart des bâtonnets se colorent nettement et uniformément, mais il s'en trouve aussi qui, comme tous les bacilles des fèces, se colorent d'une façon inégale. Il pousse bien dans tous les milieux nutritifs, sauf la pomme de terre; sur la gélose, il couvre toute la surface d'un enduit bleuâtre et uniforme; il trouble uniformément le bouillon. Les colonies sont petites, rondes, translucides, avec des bords égaux et d'une structure homogène. Il forme un peu d'acide dans le bouillon sucré, ne forme pas d'indol, ne liquéfie pas la gélatine et ne coagule pas le lait. C'est un aérobie et un thermophile absolu. L'optimum de sa croissance est à 57°, il pousse bien à 65° et cultive un petit peu à 70°. Il ne se développe pas à 37° ni au-dessous. Il n'est pas pathogène.

BACILLE N° 6.

Il fut isolé d'un enfant âgé de 3 jours. Il fut rencontré une seule fois.

C'est un bâtonnet assez gros, droit, rappelant d'aspect et de taille le *bacille de Friedlander*. Il se dispose d'habitude isolément. On ne remarque pas de spores. Il se colore très bien par toutes les couleurs aqueuses et par le Gram, de la même façon que les bacilles décrits précédemment. Il croît abondamment sur tous les milieux nutritifs, sauf la pomme de terre. Il forme sur la gélose ordinaire une couche opaque uniforme, couvrant toute la surface du milieu et rappelant la croissance sur la gélose du bacille n° 5. Il pousse aussi bien sur la gélose sucrée ; dans du bouillon, il produit un léger trouble et une pellicule friable sur la surface ; le même genre de croissance s'observe sur la gélatine. Il ne pousse pas sur la pomme de terre. Les colonies n'offrent rien de bien caractéristique : rondes, d'une structure homogène, avec des bords égaux. Il ne liquéfie pas la gélatine ; ne manifeste pas la réaction d'indol ; il forme un peu d'acide dans du bouillon sucré.

L'optimum de la croissance est à 57° ; à 64°, il pousse encore bien ; à 68° il donne des traces de croissance ; à 37°, il ne cultive pas, c'est donc un thermophile absolu. Il n'est pas pathogène.

BACILLE N° 7.

Ce bacille fut isolé d'un enfant âgé de 8 jours ; il fut retrouvé deux fois : chez un enfant âgé de 3 jours et chez un autre âgé de 7 jours.

C'est un bâtonnet mobile de 1, 2 à 3 µ de longueur, se disposant pour la plupart du temps isolément, quelquefois par groupes de deux individus, qui forment entre eux un angle aigu. Il manifeste une tendance à s'étendre en filaments, dont la longueur est égale à celle de quatre ou cinq individus pris ensemble. A 42° ce bâtonnet forme des spores ovales, rappelant beaucoup par leur aspect celles des *mesentericus* sur la gélose ordinaire ; à 57° ce bacille forme au bout de 20 heures un enduit uniforme et légèrement transparent, avec des bords très inégaux, couvrant toute la surface du milieu ; cet enduit est d'une consistance visqueuse ; il adhère un peu au milieu nutritif ; lorsqu'on le prélève, il s'étend en filaments visqueux. Au bout de 48 heures, la croissance est beaucoup plus abondante et l'enduit n'est transparent que sur les bords ; sa consistance est moins visqueuse. Sur la gélose glycérinée et sucrée, la croissance est la même que sur la gélose ordinaire, sur la pomme de terre, il donne un enduit épais, rosâtre, qui se plisse ensuite. Sur la gélatine, il croît abondamment sous forme de flocons, en formant sur la surface une pellicule dense, et à bords irréguliers. Il trouble légèrement le bouillon, forme un dépôt au fond du tube et une pellicule à la surface. C'est un thermophile facultatif, car il croît aussi très bien à 37° et à 24°. C'est un aérobie facultatif, car étant ensemencé par piqûre dans la gélose profonde, il pousse tout le long de la piqûre, ainsi qu'à la surface. Il coagule le lait à 57° ainsi qu'à 37° ; il liquéfie la gélatine. Il se colore bien par toutes les solutions aqueuses des couleurs d'aniline et par le Gram ; les spores ne se colorent que sur les bords. On le réensemence facilement encore avec une culture âgée de 2 mois. Les spores résistent à un chauffage de 5 minutes à

100° à l'autoclave; l'ensemencement de ces spores sur tous les milieux nutritifs donne une culture abondante au bout de 24 heures. Ce bacille se rattache évidemment au groupe des bacilles *mesentericus*, avec lesquels il a plusieurs caractères communs. Il fut observé 3 fois sur 20 cas examinés.

En résumé :

1° Tous les microbes isolés se présentent sous forme de bacilles;

2° La plupart d'entre eux, cinq espèces sur sept, sont des thermophiles obligatoires;

3° Toutes les espèces *thermophiles obligatoires sont des aérobies obligatoires;* les thermophiles facultatifs sont des aérobies facultatifs ;

4° Toutes les espèces se colorent par le Gram; toutes fixent les couleurs d'une façon égale ;

5° Aucune espèce, sauf le n° 7, ne liquéfie la gélatine;

6° Tous produisent de l'acide dans le bouillon sucré;

7° Aucun n'est pathogène.

DESCRIPTIONS DES MICROBES THERMOPHILES ISOLÉS DU MECONIUM ET DES FÈCES DES NOURRISSONS A PARIS

BACILLE N° 8.

Ce bacille fut isolé d'un enfant âgé de 3 jours et fut ensuite retrouvé 3 fois : chez un enfant âgé de 5 jours et dans le méconium d'un enfant de 2 jours.

C'est un bâtonnet immobile, assez gros, à bouts arrondis, et qui s'étend fréquemment en de longs filaments. Ce bacille se dispose souvent par deux ou par quatre individus, quelquefois plus, mais parfois aussi isolément. Dans des cultures âgées de 5 à 6 jours, ce bâtonnet forme de très longs filaments, qui sont quelquefois un peu recourbés; il ne forme jamais de spores à des températures élevées. A 57°, sur la gélose ordinaire, il forme un enduit abondant, dans lequel on peut discerner une structure granuleuse, si la culture est jeune de 8 à 12 heures; les bords sont inégaux, et la culture ne couvre jamais toute la surface du milieu. Il n'est pas rare d'observer des colonies isolées à côté de la strie. Sur la gélose sucrée et glycérinée, le développement est le même que sur la gélose ordinaire, peut-être un peu moins abondant. Il est facile de le prélever de la surface de la gélose.

Par son mode de développement, il rappelle la culture du bacille charbonneux. Il trouble légèrement et uniformément le bouillon et, quand on agite le tube, l'aspect est celui d'une culture du bacille charbonneux dans le bouillon. Sur la gélatine à 37°, il pousse sous forme de petits flocons, qui, au bout de quelques jours, se précipitent sur le fond du tube, laissant la gélatine transparente. Il forme sur la pomme de terre un enduit

granuleux, luisant, de couleur jaune-pâle; la couleur de la pomme de terre, elle-même, ne change pas. Il se colore bien par les couleurs aqueuses d'aniline et le Gram; dans les deux cas, on observe, à côté des bâtonnets fortement colorés, des bâtonnets à peine teintés ou qui n'ont de couleur que sur quelques grains (fig. n° 4). En employant avec la méthode de Gram une coloration supplémentaire, la fuchsine aqueuse par exemple, on observe beaucoup de bâtonnets colorés en rouge. Ce bacille forme de grandes colonies granuleuses avec des bords inégaux; les colonies, qui se trouvent au fond de la gélose, dans une culture en plaques, ont l'aspect de petits grains, un peu jaunâtres. L'optimum de sa croissance est à 57°, mais il cultive aussi à 37°, bien que moins abondamment; à cette dernière température, il ne se forme pas en filaments, mais apparaît sous forme de bâtonnets courts, dont plusieurs portent des spores (phot. n° 4) ovoïdes; quelques-uns ont un renflement au bout (à 37°). A cette dernière température, il se colore beaucoup plus inégalement qu'à 57°; il y a des bâtonnets qui n'ont qu'un seul grain coloré, de sorte qu'on pourrait prendre le bacille pour un coccus. A 22°, ainsi qu'à la température de la chambre, il ne pousse pas; à 60°, il pousse faiblement; à 65°, il ne donne pas de culture. C'est un aérobie facultatif, car, ensemencé dans la gélose sucrée profonde, il croît en même temps à la surface et dans la profondeur le long de la piqûre, quoique peu abondamment. Il ne liquéfie pas la gélatine; il ne change pas la réaction du bouillon et ne forme pas d'indol; il ne modifie pas le lait. Les spores sont assez résistantes, car elles supportent bien un chauffage de 5 minutes à 100° à l'autoclave. Il n'est pas pathogène.

BACILLE N° 9.

Il fut isolé des selles d'un enfant âgé de 4 jours, et fut retrouvé ensuite encore une fois chez un enfant âgé de 3 jours.

C'est un bâtonnet immobile, à bouts arrondis, de 0,05µ de largeur sur 2 à 5µ de longueur; il se dispose le plus souvent par deux articles, dans une direction qui n'est pas exactement parallèle; rarement il est isolé. Ce bacille forme de grandes colonies blanches, saillantes, très visqueuses, dont il est difficile de distinguer la structure. La zone périphérique de la colonie est bleuâtre, un peu transparente. A 57°, ensemencé sur la gélose ordinaire ou sucrée, il couvre presque toute la surface d'une couche homogène visqueuse, à bords irréguliers. Il pousse abondamment sur la pomme de terre, en formant une couche visqueuse et plissée, couleur de cire. Dans du bouillon, il forme un léger trouble; il pousse assez abondamment dans la gélatine en la troublant et en la liquéfiant rapidement. Il forme à la surface une pellicule très plissée; il coagule le lait et y produit un peu d'alcali. C'est un thermophile facultatif, car il pousse aussi bien à 37° et à 20°. De 42° à 45°, le plissement de ses cultures sur tous les milieux est le plus prononcé. A 20°, il liquéfie aussi la gélatine, mais en partie seulement; la plus grande partie de la gélatine reste solide. C'est un aérobie facultatif, car à 37° il se développe au fond de la gélose sucrée, ensemencée en profondeur. Ensemencé de la même façon à 57°, il ne pousse qu'à la surface. Il forme à 42° des spores

ovales au milieu du bâtonnet. Les spores sont assez résistantes à la chaleur, car elles supportent un chauffage à 100° à l'autoclave pendant 5 minutes. Il n'est pathogène, ni pour les souris, ni pour les cobayes. Il fut observé 2 fois sur 16 cas examinés.

BACILLE N° 10.

Il fut isolé d'un enfant âgé de 5 jours, et ensuite fut retrouvé 4 fois : chez un enfant âgé de 20 heures, chez un autre âgé de 7 jours et chez deux enfants âgés de 3 jours.

Ce bacille est un court bâtonnet, mobile, à bouts arrondis, se disposant parfois par deux, mais plus souvent isolément. Il se colore bien par les couleurs d'aniline, comme les espèces précédentes : à côté d'individus fortement colorés, il s'en trouve d'autres, sur lesquels la couleur n'a eu que peu ou même pas de prise; lorsqu'on se sert de la méthode de Gram avec une couleur supplémentaire, beaucoup de bâtonnets prennent celle-ci. Il pousse abondamment à 57° — 57°,5 sur la gélose ordinaire, en couvrant toute la surface d'une couche uniforme, un peu translucide sur les bords très sinueux. Cette dernière propriété est très prononcée dans des cultures en plaques, où les bords frangés d'une colonie s'étendent de tous les côtés très loin du centre, en couvrant une grande partie de la plaque. Sur la gélose sucrée, glycérinée, sa croissance est en tous points semblable à la précédente. Il trouble uniformément le bouillon et forme une pellicule friable à la surface; la pellicule tombe rapidement au fond du tube. Sur la pomme de terre, il forme un enduit graisseux d'une couleur rouge foncée; il pousse bien sur la gélatine, en formant des flocons et à la surface une pellicule rosâtre. Il liquéfie la gélatine, mais la liquéfaction n'atteint pas tout le contenu du tube, de sorte que la plus grande partie de la gélatine reste solide. Il clarifie le lait, dont la réaction devient alcaline. C'est un aérobie facultatif, car, ensemencé dans une couche profonde de gélose sucrée, il y pousse, ainsi qu'à la surface; mais c'est à la surface qu'il pousse le plus abondamment. C'est un thermophile facultatif, car il cultive à 37° aussi bien qu'à 57°; il pousse même à 20°, mais bien lentement. A 37°, l'enduit que le bacille forme à la surface de la gélose est plus dense qu'à 57°; il est plissé et adhère à la surface du milieu nutritif. L'examen microscopique d'une culture non colorée sur la gélose fait apparaître des corps ovales et fortement réfringents; ce sont probablement des spores; quelques-unes se colorent très bien et uniformément par les couleurs d'aniline, d'autres ne se colorent que sur les bords. Ces spores résistent à un chauffage de 5 minutes à 100° à l'autoclave. A 37°, ce bâtonnet forme de petites colonies jaunâtres avec un centre saillant et des bords ronds et ciliés. Il n'est pas pathogène et présente une grande ressemblance avec des bacilles du groupe *mesentericus*.

BACILLE N° 11.

Il fut isolé chez un enfant âgé de 2 jours. Il est complètement identique à l'espèce isolée à Moscou et décrite sous le nom du bacille n° 7. Il fut observé une fois sur 16 cas examinés.

LE STREPTOTHRIX THERMOPHILE N° 12.

Il fut trouvé une seule fois chez un enfant âgé de 3 jours. Les filaments de ce champignon ont une largeur d'environ 0,5μ et une longueur très grande. Ils sont droits ou sinueux, la sinuosité est quelquefois très prononcée, de sorte que les filaments ressemblent à des spirilles. Ces filaments ont une véritable ramification; les branches latérales sont disséminées irrégulièrement et partent du filament mère à des distances les plus diverses. Souvent, ces branches latérales se terminent par un renflement ovoïde ou rond, que l'on doit peut-être considérer comme des arthrospores. Les filaments et les arthrospores se colorent bien par les couleurs aqueuses d'aniline, ainsi que par le Gram ; souvent, quelques parties des filaments restent incolores; l'on trouve même des filaments entiers non colorés ou très faiblement colorés. La colonie de ce streptothrix est composée de filaments disposés en rayon, qui partent d'un centre un peu plus compact que le reste de la colonie.

Le streptothrix pousse bien et abondamment sur tous les milieux nutritifs ordinaires. A 57°, sur la gélose ordinaire, glycérinée ou sucrée, il forme des colonies luisantes, confluant ensuite et couvrant toute la surface du milieu; elles s'y enfoncent fortement, de sorte qu'en les prélevant, on prend en même temps une petite quantité de gélose. Sur pomme de terre il se forme de grandes colonies, couvertes comme d'une couche de poudre blanche, formée par les spores. Les cultures très anciennes sur pomme de terre deviennent noires. Dans le bouillon, ce champignon croît sous forme de petites sphères, qui tombent ensuite au fond du tube; avec le temps, ces sphères se désagrègent et forment des flocons; le bouillon lui-même, reste complètement limpide. Quelquefois, il se forme à la surface du bouillon des colonies blanches isolées, qui se fusionnent ensemble en formant une pellicule assez dense. La culture sur la gélatine ressemble au point de vue extérieur, à celle que l'on obtient dans le bouillon. La gélatine est liquéfiée rapidement. Le lait se peptonise et devient clair, d'une teinte jaunâtre. La réaction en est légèrement acide. C'est un microbe thermophile facultatif, car il croît très bien à 37° et à 20°; c'est un aérobie strict. Il est inoffensif pour les animaux.

En résumé :

1° Tous les microbes isolés doivent être rangés parmi les bacilles, sauf une espèce qui est un streptothrix thermophile;

2° Tous les bacilles, sauf le bacille 8 (3 sur 4), appartiennent au groupe des *mesentericus ;*

3° Tous forment des spores ;

4° Tous prennent le Gram et se colorent de la même façon que les microbes thermophiles isolés à Moscou;

5° Tous sont des thermophiles et des aérobies facultatifs ;

6° Tous, excepté le bacille 8, liquéfient la gélatine et peptonisent le lait, en produisant dans ces milieux de l'alcali;

7° Tous possèdent une assez grande stabilité, car ils supportent bien le chauffage 100° à l'autoclave pendant 5 minutes;

8° Aucun n'est pathogène.

Les caractères les plus importants de tous les microbes qui viennent d'être décrits sont résumés dans les tableaux 1 et 2.

LES MICROBES THERMOPHILES ISOLÉS DES FÈCES DES ADULTES

Les matières qui ont servi pour ces recherches ont été prises dans différentes périodes de temps sur une même personne. Les prises furent faites 8 fois.

Je continue l'énumération des bacilles.

BACILLE N° 13.

C'est un bâtonnet immobile, assez gros, à bouts arrondis, disposé isolément, ou par deux; il forme des spores ovales à l'une de ses extrémités; ces spores sont fortement réfringentes à l'état non coloré. Il croît abondamment sur la gélose ordinaire et glycérinée, couvrant toute la surface du milieu nutritif d'une couche blanche à bords ramifiés; il n'adhère pas au milieu nutritif et s'en détache facilement. Il pousse un peu moins bien sur la gélose sucrée et très peu sur la gélatine, qu'il ne liquéfie pas. Dans du bouillon il croît en flocons qui, au bout de quelques jours, se précipitent au fond du tube. Il pousse faiblement dans le lait et sur le sérum coagulé, et pas du tout sur la pomme de terre; il ne coagule pas le lait. Il se colore bien par toutes les couleurs d'aniline, ainsi que par la méthode de Gram. Quant aux spores, quelques-unes d'entre elles se colorent bien comme les bacilles, d'autres n'ont que les bords colorés. Je dois noter, en général, que certains bâtonnets se colorent fortement et uniformément par la fuchsine et le Gram; d'autres, par contre, très faiblement; quelquefois, leur pôles seuls sont colorés, le milieu reste incolore; parfois on ne voit que quelques grains colorés dans tout le bâtonnet.

Ce bacille forme de grandes colonies de structure granuleuse, avec des bords ramifiés et un centre épaissi. L'optimum de son développement est à 57°-58; il pousse encore à 67°, mais très faiblement, et donne des traces de culture à 50°; c'est un aérobie strict, car il ne se développe pas au fond de la gélose lorsqu'il est ensemencé en couche profonde. Il n'est pas pathogène, car, inoculé à fortes doses à des cobayes et à des souris, sous la peau ou dans le péritoine, il n'occasionna aucun phénomène local, ni général. Ce bacille fut trouvé 2 fois sur 6 examens des fèces.

BACILLE N° 14.

Ce bacille présente une grande ressemblance sinon une identité complète avec un bacille, isolé par moi des sources thermales et décrit déjà sous le nom de bacille n° 2 dans un article publié dans ces *Annales*[1].

1. Sur les microbes thermophiles des sources thermales. *Annales de l'Institut Pasteur*, vol. 13, 1899.

C'est un court bâtonnet immobile, qui se dispose le plus souvent isolément; il forme des spores à petite distance du bout, qui ont l'aspect pointu. Il pousse bien sur tous les milieux solides et liquides, sauf la pomme de terre. Il couvre d'une couche uniforme, demi-transparente et blanchâtre, la surface de la gélose simple et glycérinée, en y adhérant faiblement. Il pousse moins bien sur la gélose sucrée. Dans le bouillon et dans la gélatine, il croît abondamment en formant une pellicule friable à la surface; le bouillon devient trouble, mais s'éclaircit dans les cultures anciennes et on observe alors un dépôt au fond du tube; il ne liquéfie pas la gélatine.

Il ne donne pas la réaction d'indol, forme un peu d'acide dans du bouillon sucré. Ses colonies sont petites, rondes, à bords égaux, un peu bleuâtres, d'une structure homogène. C'est un aérobie facultatif, car il pousse, quoique très faiblement et lentement, dans une atmosphère d'hydrogène; il produit dans ce dernier cas une faible odeur de putréfaction. Il se colore bien par toutes les couleurs d'aniline et par la méthode de Gram; dans les spores, la périphérie seule prend la couleur. L'optimum de sa croissance est à 58°-59°, mais il pullule encore bien à 67° et 69°; à 70°, il se développe encore, mais faiblement; à 72°, il ne pousse plus. Les caractères morphologiques changent à 69°-70° : le bâtonnet ne donne plus de spores; réensemencé à 58°, il forme de nouveau des spores. Ce bacille croît faiblement à 45°, en donnant des formes d'involution et en ne formant pas des spores, Il ne pousse pas au-dessous de 45°. Il n'est pas pathogène pour les cobayes et les souris. Ce bacille fut trouvé 2 fois sur 8 cas examinés.

BACILLE N° 15.

Ce bacille présente une grande ressemblance avec le bacille n° 13; il s'en distingue par la propriété de former de très longs filaments, quelquefois fortement courbés et occupant tout le champ visuel du microscope. Les colonies qu'il forme sur la surface des plaques de gélose sont très caractéristiques; d'un centre épais sortent de tous les côtés des branches radiaires, faites d'une agglomération de cristaux (fig. n° 10); elles n'adhèrent pas à la surface du milieu nutritif, d'où on les détache facilement. Le même bâtonnet sur la même plaque peut former des colonies d'un aspect différent, si les colonies prennent naissance à une certaine profondeur dans la gélose; la colonie est alors ronde, assez petite, présentant des bords inégaux et amincis (phot. 10). Comme le bacille n° 13, le bacille n° 15 pousse abondamment sur tous les milieux nutritifs, sauf sur la pomme de terre; les caractères de ses cultures ressemblent complètement à ceux du bacille n° 13, avec cette réserve, qu'il présente une ramification beaucoup plus prononcée des bords de l'enduit formé sur la gélose; il produit des spores ovales à l'un de ses bouts, mais en quantité sensiblement moins abondante que le bacille n° 13; tout au plus rencontre-t-on dans une préparation quelques bacilles portant des spores, ce qui est, au contraire, le cas le plus fréquent pour le bacille n° 13. A tous les autres égards, ce bacille est identique au bacille n° 13. Ce bacille a été trouvé une seule fois sur huit cas examinés.

BACILLE N° 16.

Le bacille n° 16 est un petit bâtonnet immobile, il est très souvent disposé par deux; il ne donne pas de spores. Il croît abondamment sur la gélose simple, glycérinée et sucrée, en formant une mince couche uniforme, légèrement transparente et couvrant toute la surface du milieu. Il ne pousse point sur la pomme de terre. Il pousse bien dans le bouillon, qu'il rend trouble, et forme une mince pellicule à la surface et un dépôt au fond. Sur la gélatine il pousse très abondamment, forme une pellicule à la surface, mais ne liquéfie pas le milieu. Il se colore bien par toutes les couleurs d'aniline et par le Gram; certains bâtonnets prennent fortement la couleur, tandis que d'autres ne la prennent que faiblement, ou ne présentent que 2 ou 3 grains colorés. Il forme de petites colonies rondes, transparentes et avec bords réguliers. L'optimum de sa croissance est à 57°; à 70° il donne encore des traces de développement; il ne pousse pas au-dessous de 45°; à cette dernière température il pousse très faiblement et donne des formes d'involution. Il est un aérobie facultatif; car il pousse, bien que très faiblement dans l'hydrogène à la température optimum. Il ne change pas la réaction du bouillon, ne forme pas d'indol et n'est pas pathogène. Il ressemble beaucoup au bacille n° 14. Il fut trouvé une seule fois.

BACILLE N° 17.

C'est un gros bâtonnet assez grand, à bouts arrondis; il se dispose isolément ou réuni par deux. Il ne forme pas de spores. Il se colore bien par les couleurs d'aniline et prend le Gram; la façon dont il prend les couleurs est exactement la même que chez tous les autres bacilles intestinaux, décrits plus haut. Il pousse très bien sur tous les milieux nutritifs, la pomme de terre exceptée. Il forme sur la gélose ordinaire, glycérinée et sucrée, et sur le sérum solidifié, une couche blanche, épaisse, avec bords égaux; on le prélève facilement de la surface du milieu; il pousse souvent sous forme de colonies isolées. C'est dans la gélatine qu'il pousse le plus abondamment sous forme de flocons; il forme une pellicule épaisse et friable sur sa surface; dans le bouillon, il croît moins abondamment, mais présente le même aspect de flocons. Il donne naissance à de grosses colonies rondes, à bords arrondis et ayant un centre épais. L'optimum de sa croissance est à 57°; il ne pousse pas au-dessous de 50°; à cette dernière température, il ne donne que des formes d'involution. Il pousse bien à 67°, à 68° il donne des traces de culture; à 70° il ne se développe plus. C'est un aérobie et un thermophile absolu. Il ne liquéfie pas la gélatine, ne forme pas d'indol; il n'est pas pathogène. Il ne fut trouvé qu'une seule fois.

BACILLE N° 18.

C'est un petit bâtonnet, qui forme des spores, rondes (phot. n° 5) à l'un de ses bouts, comme le bacille du tétanos; il se dispose le plus souvent isolément, mais parfois réuni par deux. Il se colore bien par toutes les couleurs d'aniline et par la méthode de Gram, mais d'une façon inégale, comme les bacilles précédents (fig. 5). Il en est de même pour les spores: certaines prennent

la coloration aussi bien que les bâtonnets, mais d'autres n'ont que la périphérie colorée. Quant à ses propriétés physiologiques, ce bâtonnet présente une ressemblance complète avec les bacilles décrits plus haut. Il pousse bien sur tous les milieux nutritifs, la pomme de terre exceptée. Sur la gélose, il forme une couche uniforme, d'une teinte nacrée, couvrant toute la surface du milieu, auquel il adhère légèrement. Il trouble faiblement le bouillon, forme à la surface une pellicule mince, qui se désagrège facilement et laisse un dépôt au fond du tube. Il se comporte sur la gélatine comme dans le bouillon. L'optimum de sa croissance est à 57°-58°, mais il croît encore, bien que faiblement, à 68°. A 69°, il ne se développe plus; il ne pousse pas au-dessous de 50°; c'est un thermophile absolu; c'est aussi un aérobie absolu; il ne liquéfie pas la gélatine et ne renferme pas d'autres diastases. Il forme un peu d'acide dans le bouillon sucré. Il n'est pas pathogène. Il fut trouvé 2 fois sur 8 cas examinés.

BACILLE N° 19.

D'après ses caractères morphologiques et biologiques, ce bacille doit être rangé parmi ceux du groupe des bacilles *mesentericus*. Il est mobile, assez grand et se dispose le plus souvent par deux. Il se colore bien par les couleurs d'aniline et prend le Gram.

Il pousse très bien sur tous les milieux nutritifs, ainsi que sur la pomme de terre. A 57°, et 58° il couvre toute la surface de la gélose d'une couche abondante et uniforme, et se détache facilement; il pousse aussi dans l'eau, condensée au fond du tube, en formant à la surface une mince pellicule, qui monte sur les parois du tube. A 37° et 42°, l'enduit que forme ce bacille dans le même milieu nutritif devient plissé et sec, et adhère fortement à la surface de la gélose; il pousse abondament sur la pomme de terre où il forme une couche abondante et rosâtre, un peu sèche. Il trouble le bouillon et forme une pellicule à sa surface; au bout de quelques jours, le bouillon se clarifie et présente un dépôt au fond du tube; dans la gélatine, il croît en forme de flocons et avec une pellicule dense à la surface; cette pellicule devient plissée à des températures basses. Il liquéfie la gélatine et peptonise le lait; celui-ci s'éclaircit graduellement sous son influence, et prend une teinte jaunâtre. La présence de la peptone a été démontrée à l'aide de la réaction du biuret, ainsi que par le réactif de Millon; on avait soumis à ces deux réactifs le filtrat du lait modifié par le bacille. Il liquéfie faiblement le sérum solidifié, manifeste ses propriétés fermentatives à de hautes aussi bien qu'à de basses températures. Il forme de l'acide dans le bouillon sucré. Ce bacille se groupe en colonies bien caractéristiques; les colonies jeunes, à 37° aussi bien qu'à 57°, prennent un aspect irrégulier, rappelant des touffes de cheveux, les colonies âgées de plus de 24 heures ont une forme ronde avec de bords festonnés et adhèrent fortement à la gélose. Ce bacille est un aérobie absolu, à des températures élevées, car, ensemencé sur la gélose sucrée, d'après la méthode de Liborius, il ne se développe qu'à la surface, Ensemencé par le même procédé à 37°, il pousse faiblement le long de la strie au fond du tube. Il n'est pas pathogène. Il fut retrouvé deux fois sur 8 cas examinés.

N° 20. LE STREPTOTHRIX THERMOPHILE.

A l'examen microscopique, il se présente sous forme de filaments spiralés, d'une grosseur de 0,6 μ, avec une vraie ramification (fig. 7). A l'extrémité des filaments on observe souvent des renflements ovoïdes, peut-être des spores (phot. n° II). Il se colore bien par les couleurs d'aniline, et prend le Gram. Il y a des filaments, qui se colorent très fortement et d'une façon uniforme; il y en a d'autres, qui ne présentent qu'une coloration inégale, et montrent seulement quelques granulations colorées. Il forme sur la gélose des colonies radiées, qui se couvrent, au bout de deux jours et quelquefois plus tôt, d'une couche de poudre blanche. Il croît abondamment sur la gélose simple, glycérinée et sucrée; dans le bouillon il forme des flocons comme toutes les espèces de ce genre en laissant le milieu limpide; sur la pomme de terre, la culture ressemble à une sorte de poudre blanche qui, examinée au microscope, présente beaucoup de corpuscules ronds, spores et courts filaments. Il pousse bien dans la gélatine, mais ne la liquéfie pas, n'altère pas le lait et ne manifeste la présence d'aucune diastase. Il forme de l'acide dans le bouillon sucré. L'optimum de son développement est à 57°-58°; à 66°, il croît faiblement; à 67°, il ne pousse point; d'autre part il ne croît pas au-dessous de 45°. C'est un aérobie absolu, car, ensemencé sur la gélose sucrée, d'après la méthode de Liborius, il ne se développe qu'à la surface de la gélose. Il n'est pas pathogène vis-à-vis des animaux du laboratoire. Il ne fut retrouvé qu'une seule fois.

En rapprochant les caractères des microbes thermophiles intestinaux, isolés à Paris. de ceux des bacilles obtenus à Moscou, nous devons noter tout d'abord que :

1° Deux espèces parmi eux sont sans aucun doute identiques : le bacille n° 7 est entièrement semblable au bacille n° 11 ; de plus, les bacilles n°s 10' et 9 (Paris) et 19 (Moscou) ont également beaucoup de caractères communs avec les deux espèces qui viennent d'être citées. Ces cinq espèces sont très analogues, sinon identiques, aux bacilles du groupe des bacilles « *mesentericus* ». Toutes les autres bactéries isolées appartiennent à d'autres espèces.

2° La flore microbienne thermophile des enfants de Paris est moins variée que celle des enfants de Moscou. Ainsi, dans les 20 cas examinés à Moscou, le méconium et les fèces des enfants ont donné des espèces pour la plupart différentes. Quant aux recherches faites à Paris, dans 18 cas nous avons pu toujours constater le développement des quatre mêmes espèces décrites plus haut : les bacilles n°s 8, 9, 10, 11. Ce n'est que le streptothrix qui fut trouvé une seule fois et dans un seul cas. Il est à remarquer que ces quatre espèces ne se rencontraient pas

invariablement à chaque examen des fèces, comme cela a eu lieu pour le *bac. bifidus* (37°), mais, chaque fois que l'on constatait une culture dans un des tubes, c'était toujours une de ces quatre espèces que l'on observait ; le plus souvent on trouvait les bacilles nos 10 et 11. Il faut noter aussi qu'en général, plusieurs parmi les tubes ensemencés à Paris restaient définitivement stériles, tandis qu'à Moscou le nombre des tubes ayant donnés un résultat négatif a été toujours moindre que celui de Paris. La flore microbienne des enfants de Moscou est peut-être en effet différente, mais on pourrait également admettre que la plus grande variété des espèces et le nombre plus élevé des germes constatés à Moscou ne sont dus qu'à une cause accidentelle, comme, par exemple, à une moindre propreté dans les soins donnés aux enfants. Des recherches ultérieures pourront élucider cette intéressante question.

3° Tous les microbes thermophiles isolés à Paris appartiennent aux espèces de thermophiles facultatifs et aux aérobies facultatifs, tandis que la plupart des microbes obtenus à Moscou sont des thermophiles et des aérobies obligatoires.

Cette dernière circonstance a, selon nous, une signification importante, et pour la raison suivante : il est évident que les thermophiles et les aérobies obligatoires ne trouvent dans le canal intestinal de l'homme ni la température élevée qui leur est nécessaire, ni les conditions favorables au libre accès de l'oxygène. Nous devons donc choisir entre deux interprétations : 1° ces microbes ne seraient que de passage dans le canal intestinal de l'homme ; 2° ils y trouveraient les conditions favorables, peut-être une symbiose, leur permettant de se développer à une température de 37°. Dans ce dernier car ils auraient peut-être un rôle important à remplir dans les processus qui s'accomplissent dans le canal intestinal de l'homme.

Un intérêt tout particulier s'attache à deux microbes décrits sont les n° 10 et 11 et dont le dernier est commun aux flores microbiennes des enfants de Moscou et de Paris.

L'étude de ces espèces m'a amenée à conclure qu'elles sont presque identiques aux *bacillus mesentericus vulgatus et fuscus*. Afin de faire une comparaison immédiate entre ces deux espèces et les miennes, je me suis servie des cultures du *bac. mesentericus fuscus* et *vulgatus* de la collection de l'Institut

Pasteur, ainsi que de celles obtenues par M. Cohendy, pendant l'étude qu'il fit au laboratoire de M. Metchnikoff sur la flore microbienne du gros intestin de l'homme.

En comparant les cultures que j'ai empruntées avec celles que j'ai isolées des fèces, j'ai pu me convaincre de leur identité, qui se manifeste surtout à 37°.

Nous avons constaté en passant un fait curieux : les deux bacilles de M. Cohendy, ainsi que ceux de la collection de l'Institut Pasteur, possédaient des propriétés thermophiles : ils poussaient très bien à 57°, quoique peut-être un peu moins abondamment qu'à 37°. J'avais observé un fait analogue, il y a quelques années, lors de mes recherches sur les bacilles thermophiles des sources thermales.

J'avais constaté alors la ressemblance entre un bacille thermophile et *bac. subtilis* ordinaire. Pour vérifier cette ressemblance, j'ai pris du laboratoire de l'Institut bactériologique de Moscou une culture de *bacillus subtilis*, je l'ai mise à l'étude à 57°, et j'ai constaté son développement à cette température élevée. Le fait que les bactéries ordinaires possèdent des propriétés thermophiles, fait constaté plus d'une fois, ainsi que nous l'avons vu, confirme la supposition exprimée autrefois par nous que les bactéries thermophiles et les bactéries ordinaires ont une origine commune : les premières auraient acquis leurs propriétés thermophiles par leur adaptation au milieu extérieur; ou encore, les microbes ordinaires auraient pour ancêtres les microbes thermophiles, qui se seraient adaptés graduellement à de basses températures.

LE SORT DES MICROBES THERMOPHILES DE L'INTESTIN DE L'HOMME DANS LE CANAL INTESTINAL DE JEUNES LAPINS

Pour compléter l'étude des propriétés biologiques ci-dessus décrites des bactéries thermophiles, peuplant avec les microbes ordinaires le canal intestinal de l'homme de tout âge, nous avons entrepris, suivant le conseil de M. Metchnikoff, l'étude du sort de ces bactéries dans l'organisme des lapins. Nos expériences consistaient à faire ingérer aux lapins les cultures thermophiles. J'espérais déterminer de cette façon le degré de stabilité de mes microbes vis-à-vis des sucs gastrique et intestinal du lapin. La flore microbienne intestinale des lapins

pendant qu'ils tettent étant très simple [1], il est particulièrement facile d'y constater la présence des bactéries thermophiles, que l'on a choisies pour leur faire ingérer.

L'expérience fut faite sur 3 lapins âgés de 4 jours. L'un d'eux fut tué et servit de contrôle ; aux deux autres on fit ingérer une émulsion de bouillon faite avec une culture sur gélose des bacilles, 8, 10 et 12, et de E (streptothrix thermophile), tous, microbes thermophiles facultatifs. On introduisait l'émulsion une fois par jour à l'aide d'une pipette. A l'autopsie du lapin de contrôle, on fit dans du bouillon et sur la gélose des ensemencements du contenu de l'estomac, des intestins grêles et du gros intestin, et le tout fut placé à l'étuve à 57°. On fit en outre des préparations microscopiques du contenu de l'estomac et des intestins grêles, ainsi que du gros intestin. L'observation microscopique ne décela qu'une flore très simple, consistant en trois espèces bactériennes : des bâtonnets courts, très minces, peu nombreux, et des petits coccus, peu abondants aussi, réunis le plus souvent par deux. Ce qui était caractéristique et très curieux dans la flore de ce lapin, c'est qu'on y remarquait en même temps beaucoup de spirilles très grêles et ne prenant pas le Gram. Ces spirilles étaient en nombre beaucoup plus abondants que les deux autres espèces mentionnées.

Ces spirilles furent plus tard retrouvés chez tous les jeunes lapins de la même nichée au nombre de six. Au bout de 48 heures, un des deux lapins fut tué ; on fit l'ensemencement à 57° du contenu de son estomac, de ses intestins gros et grêle ; on fit en même temps des préparations microscopiques. On obtint les résultats suivants : il y eut à 57° une croissance abondante déjà au bout de 18 heures dans tous les tubes témoins ensemencés, tandis que les tubes témoins ensemencés, provenant du premier lapin restèrent stériles pendant 48 heures et ne donnèrent pas du tout de cultures, comme nous avons pu le constater plus tard. L'examen microscopique du contenu des tubes ayant donné des cultures révéla le mélange des deux espèces de bacilles thermophiles 8 et 10, avec lesquelles avaient été nourris les lapins ; seule la présence de streptothrix

1. Ce fait est mis en évidence par les travaux de M. Metchnikoff sur le choléra ; il a été constaté de même par M. Tissier. (METCHNIKOFF, *Annales de l'Instit. Pasteur*. 1894, 4e Mémoire.)

thermophile ne fut pas constatée. Quant aux préparations microscopiques, faites avec le contenu intestinal du lapin traité, on y découvrit une plus grande variété de formes bactériennes : à côté de minces bâtonnets et des coccus décrits plus haut, on y remarqua des bacilles qui s'en distinguaient par des dimensions plus considérables, et qui ressemblaient beaucoup aux bactéries thermophiles dont on nourrissait les lapins. L'expérience fut répétée encore une fois sur un autre lapin de la même nichée et donna les mêmes résultats. Le second des deux lapins employés dans la première expérience fut tué au bout de 96 heures, après avoir été nourri pendant tout ce temps avec des microbes thermophiles. L'autopsie fut pratiquée en même temps que des ensemencements et des préparations microscopiques. On obtint les cultures au bout de 18 heures et on constata dans un des tubes une colonie de streptothrix thermophile. Ce dernier était donc passé intact à travers le tube digestif entier du lapin, ayant parfaitement conservé sa vitalité.

En même temps que ce second lapin d'expérience (nourri de microbes thermophiles, pendant 96 heures), un nouveau lapin du même âge (n'ayant pas été nourri de microbes thermophiles) fut tué. Le tableau microscopique de ses fèces ne fut plus aussi simple que celui présenté par le premier témoin (âgé de 4 jours) : bien que les espèces prédominantes fussent toujours les mêmes, les spirilles, les petits bâtonnets grêles et les petits coccus, le nombre des spirilles n'était pas pourtant si grand que chez le premier, et, à part les espèces typiques, on observait un petit nombre d'autres bacilles et de coccobacilles de différentes dimensions. Le tableau microscopique était donc assez hétérogène, surtout après la coloration par la méthode de Gram. Étant donné que la flore microbienne intestinale du lapin devenait plus compliquée, on devrait, peut-être, rapporter ce fait de l'infection ascendante des fèces à une contamination provenant de l'air ou d'autres sources. L'ensemencement à une température de 56°-57° des fèces d'un lapin du même âge et qui ne fut pas nourri de microbes thermophiles ne donna pas néanmoins de cultures, contrairement au fait constaté chez le lapin nourri avec les microbes thermophiles.

Il était en outre intéressant de savoir si les microbes thermophiles, « obligatoires » conservent aussi leur vitalité dans le

tube digestif du jeune lapin? Dans ce but, on prit une seconde nichée contenant également 6 lapins. On les nourrit avec les trois espèces de microbes thermophiles obligatoires, notamment les bacilles n°s 1, 8 et 15 isolés des fèces d'adultes et d'enfants originaires de Moscou. Deux de ces espèces formaient des spores et la 3e n'en donnait pas. L'expérience fut faite comme la précédente : on prit deux lapins âgés de 4 jours, et on nourrit l'un d'eux avec une émulsion des trois cultures mentionnées.

Quelquefois, au lieu d'une émulsion en bouillon de ces cultures, on prélevait avec une pipette une couche d'une culture sur gélose et on l'introduisait directement dans la bouche de l'animal, qui léchait volontiers tout ce qui se trouvait sur la pipette.

Je dois ajouter que l'ingestion dans les deux séries d'expériences des microbes thermophiles n'agissait pas défavorablement sur les lapins; ceux-ci conservaient toujours leur aspect habituel.

Le second lapin servit de témoin et fut tué le premier jour du traitement appliqué au premier lapin. On fit des ensemencements et des préparations microscopiques du contenu de son tube digestif.

Le tableau microscopique fut quelque peu différent de celui des lapins de la première nichée : il fut encore plus simple et présenta presque uniquement des bâtonnets grêles et de petits coccus; les spirilles furent en très petit nombre.

Au bout de 72 heures, on tua le premier lapin; à l'autopsie, on fit des ensemencements et des préparations microscopiques.

On obtint des cultures dans tous les tubes au bout de 18 heures; les tubes de contrôle restèrent stériles.

Quant au tableau microscopique fourni par les fèces de ce lapin, il ne se distingua pas beaucoup de celui du lapin témoin de 4 jours, tué au début de l'expérience; il n'y eut donc pas d'infection ascendante sensible, comme cela avait été le cas chez les individus de la première nichée.

Nous voyons ainsi que les microbes thermophiles obligatoires, qui ne poussent pas à 37° sur les milieux ordinaires, conservent leur vitalité dans l'organisme du lapin, dans le contenu de l'estomac aussi bien que dans les intestins grêles et gros. Y conservent-ils seulement leur vitalité, ou bien sont-ils

même capables de s'y développer, — c'est ce que l'expérience, qui vient d'être citée, ne peut établir d'une façon précise.

Pour se rendre compte du temps que les microbes thermophiles peuvent passer dans le canal intestinal du lapin sans perdre leur vitalité, on fit l'expérience suivante : un des lapins de la seconde nichée a été nourri pendant 3 jours de microbes thermophiles; après quoi cette ingestion fut interrompue pendant une semaine. Au bout de ce laps de temps, le lapin en question fut tué. On en fit l'autopsie; l'ensemencement du contenu du tube digestif donna des résultats positifs : on retrouva encore des colonies de microbes thermophiles bien qu'en petite quantité.

Ces expériences sur des lapins offrent aussi, dans leur ensemble, un intérêt assez marqué, bien que sans rapport direct avec mon sujet; elles permettent, notamment, de se faire, jusqu'à un certain point, une idée de la flore microbienne intestinale des jeunes lapins. Dans la littérature microbiologique, il n'y a, sur ce sujet, que les indications données par M. Metchnikoff dans son travail déjà mentionné sur le choléra.

L'autopsie de 8 lapins et les recherches microscopiques et bactériologiques faites sur le contenu de leurs tubes digestifs confirmèrent les indications de M. Metchnikoff sur la simplicité de la flore microbienne intestinale des jeunes lapins. Elles concordent aussi avec les observations que M. Tissier nous a communiquées verbalement et qu'il a faites sur la flore microbienne intestinale d'un jeune lapin de 4 jours; M. Tissier n'a constaté dans les fèces de ce dernier qu'un petit nombre de bâtonnets grêles et de petits coccus. Quant à mes propres expériences, l'autopsie de 8 jeunes lapins a démontré dans les fèces : 1° la présence constante de petits bâtonnets typiques et de petits coccus. Les uns comme les autres prennent le Gram et constituent, pour ainsi dire, les espèces bactériennes obligatoires du canal intestinal du lapin; 2° à part ces deux espèces, d'autres microbes, microbes facultatifs, s'y trouvent en petit nombre et peuvent varier. Ainsi, dans un cas, ce sont les spirilles grêles, que nous avons observés, dans un autre cas de gros bâtonnets de différentes dimensions, bien distincts de petits bacilles typiques minces.

Pour terminer le présent article, nous tâcherons de résumer

en peu de mots nos principales conclusions. En étudiant la flore microbienne du canal intestinal des nourrissons et des personnes adultes, nous avons pu nous convaincre qu'outre le grand nombre des bactéries qui y poussent à la température intestinale habituelle, nous y observons toute une série de *microbes thermophiles*, et non seulement des thermophiles facultatifs, mais encore des thermophiles obligatoires.

Les microbes thermophiles apparaissent dans le canal intestinal de l'homme en même temps que les bactéries ordinaires, c'est-à-dire dès les premières heures de sa vie extra-utérine.

La flore thermophile des fèces des nourrissons ne se distingue pas par cette constance et cette uniformité, qui sont si caractéristiques de la flore normale ordinaire du canal intestinal de l'enfant; elle peut varier, suivant les conditions locales, climatériques, et peut-être selon d'autres circonstances analogues.

Il est très probable que les microbes thermophiles du canal intestinal ne jouent pas un rôle important dans les processus chimiques qui s'y accomplissent et ne représentent que des microbes de passage. Leur constante présence dans les fèces trouve peut-être son explication dans leur large propagation dans la nature ainsi que dans leur grande résistance, que mes expériences sur le sort de ces bactéries dans l'organisme du lapin contribuent aussi à démontrer.

Enfin, mon travail a fourni un nouvel appui à l'hypothèse émise par moi il y a trois ans, à savoir que les microbes thermophiles ne sont que des variétés des microbes ordinaires non thermophiles.

En terminant, je veux exprimer ma plus vive reconnaissance à M. Metchnikoff, qui a bien voulu me confier le sujet qui l'intéresse et m'aider dans ce travail par ses conseils.

Je remercie aussi MM. les docteurs Tissier et Cohendy pour l'intérêt qu'ils ont témoigné à mon travail et les services multiples rendus pendant le cours de mes recherches.

Je dois les photographies reproduites p. 221 à MM. les docteurs Berestnieff et Vlassilsky; je leur adresse, à cette occasion, tous mes remerciements.

Sceaux. — Imprimerie Charaire.

Le Gérant : G. Masson.



17me ANNÉE AVRIL 1903. N° 4

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

SUR LE MAL DE CADERAS
OU
FLAGELLOSE PARÉSIANTE DES ÉQUIDÉS SUD-AMÉRICAINS

Par le Dr M. ELMASSIAN
DIRECTEUR DE L'INSTITUT BACTÉRIOLOGIQUE DU PARAGUAY
(Envoyé en mission par l'Institut Pasteur)
ET LE Dr E. MIGONE, PRÉPARATEUR

(Avec la planche VII).

Dans une Note présentée à la Société de Biologie le 4 mai 1901, M. Nocard disait : « A l'heure actuelle, on connaît trois maladies graves des animaux qui sont causées par des Trypanosomes : le *Surra* de l'Inde, le *Nagara* ou maladie de la tsé-tsé de l'Afrique australe, et la *Dourine*, des équidés reproducteurs. »

Mais dès le 19 du même mois, une nouvelle maladie à Trypanosomes, étudiée par nous en Amérique du Sud, le *Mal de Caderas*, venait prendre place à côté des 3 maladies citées, et amplifiait ainsi d'une façon notable l'aire géographique jusqu'alors connue des infections flagellaires du gros bétail. La découverte de Theiler [1], d'une affection trypanosomique, propre aux bovidés; celle de Dutton [2], d'un Trypanosome humain, montrent aujourd'hui combien doit être vaste le rôle pathogénique des Trypanosomes dont, peut-être, nous ne connaissons encore qu'une partie.

Dans une première conférence faite à Assomption [3], nous

1. A. Laveran, Sur un nouveau Trypanosome des bovidés. *C. R. Académie des Sciences*, Tome CXXXIV, n° 9, 3 mars 1902.
2. A. Laveran et F. Mesnil, *Annales de l'Institut Pasteur*, janvier 1902. — *C. R. Acad. des Sc.*, 3 mars 1903.
3. M. Elmassian, Mal de Caderas; Conférence faite au Conseil d'hygiène, Assomption, le 19 mai 1901. — *Anales de la Universidad Nacional*, Asuncion, Tomo I, Numero 1.

avons pour la première fois déterminé la nature trypanosomique du Mal de Caderas et décrit les principaux symptômes ainsi que les lésions les plus essentielles qui l'accompagnent. Dans une seconde conférence faite dans le courant de la même année, à Buenos-Ayres, dans la salle de la Société rurale Argentine, nous avons précisé le tableau clinique de l'affection spontanée, la morphologie, l'évolution, et l'action de son parasite sur les diverses espèces animales; enfin nous y avons décrit une forme nouvelle, chronique, connue sous le nom de Baacy-Poy, considérée jusqu'alors comme une infection différente du Mal de Caderas par les éleveurs du Paraguay.

Depuis ont paru sur le même sujet deux publications de O. Voges, dans lesquelles cet auteur confirme en partie nos observations et nos conclusions; mais il expose d'autres faits complètement inexacts, comme, par exemple, la sensibilité des volailles à l'agent infectieux du mal, la division transversale de ce dernier au cours de son évolution, etc., etc.

Le travail de M. J. Zabala porte surtout sur les essais de reproduction expérimentale du Mal de Caderas chez un grand nombres d'espèces sensibles ou réfractaires, le tout accompagné de photographies explicatives sur les diverses positions et allures des animaux rendus malades.

La récente publication de M. J. Lignières, directeur de l'Institut bactériologique de Buenos-Ayres, est d'une valeur réelle.

On y trouve une longue série de faits expérimentaux concernant l'agglutination du parasite, sa vitalité, surtout dans le sérums d'espèces réfractaires, et enfin une minutieuse étude de la reproduction expérimentale de l'affection. — Cette étude, jointe à quelques observations sur la morphologie du parasite, a permis à ce savant de considérer l'entité morbide qui nous occupe comme différente de celles qui ont une certaine similitude avec elle.

Nous tâcherons de résumer brièvement, dans les lignes qui suivent, les principales notions définitivement acquises sur l'histoire clinique et microbiologique du Mal de Caderas, en y ajoutant la description d'une nouvelle forme, spasmo-paralytique, que nous avons eu dernièrement l'occasion d'étudier au Paraguay.

*
* *

ÉTUDE MICROBIOLOGIQUE

La nature infectieuse et contagieuse du Mal de Caderas, soupçonnée depuis longtemps par les éleveurs et les savants, n'avait cependant pas été établie d'une façon définitive avant que nous abordions cette étude. Lacerda croyait avoir démontré que cette affection était produite chez les équidés par une moisissure existant dans les eaux d'alimentation, et qui envahirait l'organisme par les voies digestives, tandis que Lecler l'attribuait à une bactérie du type colibacillaire qu'il isola, *post mortem* de la sérosité péritonéale de chevaux ayant succombé à ce mal.

Dans la République Argentine, dès 1897, le Mal de Caderas avait été l'objet d'études particulières de la part des docteurs Malbran et Zabala, et, à partir de 1899 seulement, du Dr O. Voges, « sans que la nature exacte de la maladie ait pu être déterminée. » (Lignières). — Nous avons été les premiers à démontrer que le véritable agent pathogène est un flagellé du groupe des Trypanosomes, assez semblable à ceux rencontrés dans les différentes affections trypanosomiques des équidés; plus tard O. Voges a capricieusement dénommé *Trypanosoma equina* le Trypanosome que nous avions découvert.

Ce flagellé est effilé, long de 20 à 25 μ (flagelle non compris), large de 2-3 μ, constitué comme ses congénères par un *protoplasma* contenant quelques granulations (chromatiques), un *noyau* ovale situé le plus souvent au milieu de son corps. Un filament prend naissance à une des extrémités du parasite, le suit parallèlement jusqu'à l'autre, où, devenant libre, il donne lieu à un *flagelle*. Entre ce dernier et le corps du parasite se trouve un mince ruban, ondulé et réfringent: c'est la *membrane ondulante*. Tous ces détails structuraux intimes du parasite ne sont visibles avec précision qu'après coloration par une des méthodes qui sont journellement employées à cet effet pour d'autres Trypanosomes.

Nous avons imaginé d'utiliser dans ce but un mélange de solutions d'hématéine et de rouge Magenta que nous préparons ainsi qu'il suit :

Hématéine	0gr,50		solution A.
Alun ammoniacal	5	gr.	
Eau	100	cc.	

Rouge de Magenta	1	gr.	solution B.
Alcool absolu	10	cc.	
Eau	100	cc.	

Du sang contenant des Trypanosomes est étendu sur des lames, fixé dans l'alcool absolu au moins pendant 12 heures, et laissé pendant 1-3 heures dans un bain de bichromate de potasse à 5 0/0. Après quoi, les lames sont lavées soigneusement à grande eau, et colorées pendant un quart d'heure ou plus, s'il le faut, par le mélange de ces deux solutions (5 c. c. de la première et une goutte de la seconde). Il est parfois avantageux de soumettre successivement les lames à l'action de ces deux colorants au lieu de le faire simultanément, ainsi qu'il vient d'être exposé. De cette façon, on peut prolonger l'action de l'hématéine sans craindre une surcoloration de la part du magenta. L'adjonction de 20 à 30 grammes de glycérine pour cent de solution d'hématéine donne souvent, on le sait, plus de stabilité au colorant et plus de netteté à son pouvoir électif. Il est juste d'ajouter que la coloration obtenue par le procédé d'hématéine-magenta — quoique très suffisante pour étudier la structure et l'évolution du parasite dont nous nous occupons — n'est pas aussi belle que celles obtenues par les méthodes Laveran et autres.

Le Trypanosome du Mal de Caderas coloré par notre méthode présente son noyau en violet, son flagelle en rouge foncé, son protoplasma en rouge livide, et sa membrane en rouge clair. Mais en outre de ces diverses parties constitutives, on observe encore à l'intérieur du protoplasma, près de l'extrémité obtuse non flagellée du parasite, un grain sphérique, parfois assez gros pour occuper toute la largeur du corps, qui ne fixe ni l'hématéine ni le magenta; c'est à peine s'il se teint légèrement en rose; rarement on voit à son centre un tout petit point brun. Cet organe peut faire défaut chez les jeunes individus, mais jamais chez l'adulte, où il est invariablement le point de départ du filament.

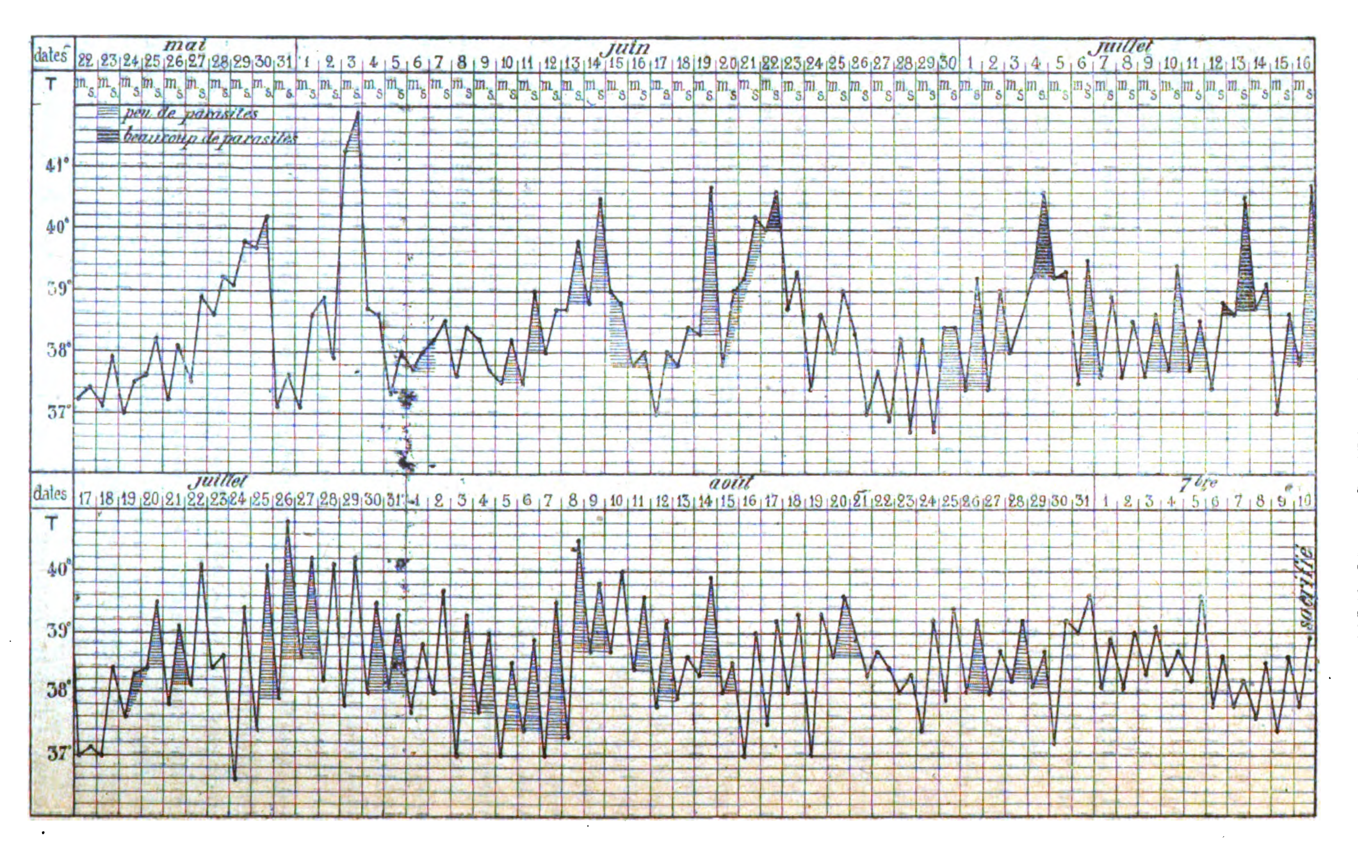
Chez les *Trypanosoma Evansi, Brucei et Rougeti*, on constate, après coloration par les méthodes Laveran et Romanowsky, un point fortement coloré auquel aboutit toujours le filament flagellaire; ce petit organe a été nommé tour à tour *micronucleus* (Plimmer et Bradford) et *centrosome* (Laveran et Mesnil). Nous n'avons pas encore eu entre les mains ces divers Trypanosomes pour pouvoir nous rendre compte de la façon dont ils se coloreraient par notre méthode. Par contre, il est établi que le grain

sphérique de notre Trypanosome — que nous appellerons *corpuscule rond*, pour ne préjuger en rien de sa signification morphologique — est incolorable (ou invisible) par la méthode Laveran. C'est M. Lignières qui, le premier, a observé cette particularité, et il a bien voulu nous en faire part l'année dernière lors de notre voyage à Buenos-Ayres. Pour lui, nous disait-il, cela pourrait constituer un point de différenciation de notre Trypanosome, des autres, voisins.

D'autre part, M. Mesnil (de l'Institut Pasteur), à qui nous avons envoyé des préparations non colorées du Trypanosome du Mal de Caderas, constatait de son côté le même phénomène et nous l'annonçait dans une lettre, en ajoutant que c'était là, pour lui, le seul point qui permettrait de distinguer morphologiquement notre Trypanosome des autres [1].

Mais ni l'un ni l'autre de ces deux savants n'insiste sur l'existence du « corpuscule rond », qu'il soit colorable ou non. On conçoit du reste qu'on n'arrive pas à le voir par la méthode bleu de méthylène — éosine — tannin, car, par cette méthode, le protoplasma du parasite est à peine coloré en bleu clair, ce qui ne permet pas de voir par contraste le corpuscule rond, incolorable, alors qu'on l'observe très bien par la méthode hématéine-magenta, et même en employant ce dernier colorant tout seul. Ce corpuscule est tellement gros qu'il soulève, à son niveau, les deux bords du parasite; par conséquent, on ne peut pas l'assimiler à une zone claire ainsi qu'on l'a prétendu. Dans le sang du singe et au moment où il se produit une prodigieuse multiplication des Trypanosomes, l'étude de ces corpuscules est plus aisée. Leur nombre, à l'intérieur d'un Trypanosome, est égal à celui des noyaux, sauf le cas où il y a un commencement de division du flagelle; cela prouve que, dans l'évolution du parasite, la division des corpuscules peut parfois précéder la division des noyaux.

1. Nous avons pu récemment, M. Laveran et moi, faire une étude morphologique précise du Trypanosome du *Caderas*, grâce à l'envoi qu'ont bien voulu nous faire MM. Elmassian et Lignières d'un cobaye « caderé » qui nous a servi de point de départ pour infecter des mammifères variés. Nous avons constaté, sur préparations colorées par la méthode de Laveran, que le Trypanosome du caderas possède un centrosome; mais il est particulièrement difficile à voir, à cause de son extrême petitesse (1/3 ou 1/4 de μ de diamètre) et de sa coloration rose identique à celle du flagelle qui en part. Les centrosomes des autres Trypanosomes se colorent en violet et sont plus gros. Nous arrivons, comme MM. Elmassian et Lignières, à la conclusion que la structure de la partie du corps qui sert de base au flagelle constitue la particularité morphologique du *Trypanosoma equinum* (voir Laveran et Mesnil, *C. R. Ac. Sc.*, 17 novembre 1902). — F. Mesnil.



Observation 10.

Le nombre des Trypanosomes dans le sang des Équidés atteints du Mal de Caderas est variable suivant la période de l'affection où on fait l'examen. En général très rares au début, ils deviennent nombreux à mesure que la mort se rapproche. Mais jamais, sauf le cas d'une infection très grave, très aiguë, leur présence dans cette humeur ne devient permanente. Ils y apparaissent lorsque la température de l'animal est au-dessus de 38° et ils disparaissent lorsqu'elle atteint 41°.

Le cours d'une infection spontanée est entrecoupé de périodes plus ou moins longues, pendant lesquelles il est impossible de constater au microscope un seul parasite; cependant l'injection, en ce moment, de quelques gouttes de sang aux espèces réceptives prouve l'état tout apparent de stérilité de cette humeur. Il suffit de jeter un coup d'œil sur les tracés pour se rendre exactement compte de cette variation.

Le Trypanosome du Mal de Caderas est mobile comme tous les autres. Sa mobilité présente toutefois un caractère assez spécial. Dans une goutte de sang chargé de ces parasites vivants « on le voit se déplacer tantôt en effectuant avec son corps des *ondulations flexueuses* en *lanière de fouet*, tantôt faisant contracter et distendre son corps à la façon d'un serpent; d'autres fois rapprocher ses deux extrémités et immédiatement s'infliger une brusque expansion, enfin, quoique rarement, présenter des mouvements d'oscillation et de rotation rapides. Pendant tous ces mouvements, on voit onduler la membrane.

Sa vitalité est, en dehors de l'organisme, en rapport inverse avec le degré de température. Selon M. Lignières, il peut vivre dans la glacière jusqu'à trois jours, en conservant sa mobilité, quoique très diminuée.

La multiplication de ce Trypanosome à l'intérieur de l'économie s'effectue par division directe et longitudinale, commençant indifféremment par l'un ou l'autre bout du parasite, plus souvent par son extrémité flagellaire (antérieure) que par l'autre, obtuse (postérieure). On étudie bien cette division chez les animaux qui, grâce à leur exceptionnelle sensibilité, donnent lieu à une prodigieuse multiplication des parasites dans leur système circulatoire, comme par exemple : le singe, la souris, le rat. Chez le premier, le Trypanosome du Mal de Caderas est très volumineux, plus encore chez la souris. Avant sa divi-

sion, on le voit augmenter de largeur, son *corpuscule rond* et son *filament* se dédoubler sans perdre le contact entre eux. A ce moment, le noyau est déjà plus allongé et, plus tard, on le voit séparé en deux par une raie claire. Les deux noyaux s'éloignent l'un de l'autre et chacun d'eux se loge sur un bord du Trypanosome. Le dédoublement du filament parfois s'achève tardivement et on voit à un moment donné le protoplasma du parasite traversé en partie par un bout de filament dédoublé qui indique le sens de la division qui va se produire. Elle est quelquefois très capricieuse. Jamais il ne nous a été donné, au cours de ces études, d'observer de division transversale. M. Lignières nous confirme entièrement sur ce point.

Dans une goutte de sang chargée de Trypanosomes du Mal de Caderas, on voit souvent au microscope deux de ces parasites se rapprocher par leurs bouts postérieurs, paraître se confondre en un seul, et un moment après se séparer pour reprendre leur forme antérieure. Les préparations colorées en présentent de nombreux exemples, où on trouve à peine une ligne de démarcation entre deux individus ainsi accollés.

* * *

ÉTUDE CLINIQUE [1] ; FORME COMMUNE DU MAL DE CADERAS

Le *Mal de Caderas* est une maladie infectieuse qui atteint les équidés d'une façon générale, mais plus spécialement l'espèce chevaline, et qui est caractérisée dans ses signes extérieurs par un amaigrissement progressif, une anémie profonde, aussi et surtout par une parésie très prononcée du train postérieur, laquelle se généralisant amène finalement la mort. En considération de ce qui précède nous l'avons dénommée *flagellose parésiante des équidés.* » Nous y ajouterons les mots *sud-américains* pour mieux désigner son origine. M. Lignières préfère l'appeler *Trypanosomose des équidés sud-américains* qui la différencie autant des autres affections à Trypanosomes sans cependant préciser mieux sa nature clinique exacte.

En raison de la grande réceptivité spontanée de la race chevaline vis-à-vis de cette injection trypanosomique, c'est cette race qui lui paye le plus large tribut dans nos régions. Le mulet,

1. Pour la description clinique de cette affection, nous ferons un large emprunt à nos publications antérieures qui, en partie publiées en espagnol, n'ont pas été traduites en français.

quoique plus résistant, n'échappe pas à la maladie naturelle, tandis qu'il est exceptionnel de voir l'âne en être victime. Étant données ces considérations, l'étude du Mal de Caderas spontané du cheval devient d'un intérêt réel, et c'est du reste la seule qui soit bien connue à l'heure actuelle. Nous prendrons par conséquent cette maladie spontanée comme type pour notre description.

« Le début de l'affection, chez le cheval, est insidieux ; en dehors de l'amaigrissement qui est rapide et progressif, rien n'éveille l'attention. En quelques jours, la consomption de l'animal devient visible à l'œil, bien que le bon appétit soit conservé. De temps à autre, l'animal est haletant, poussif, l'œil fixe, la tête baissée, semblant être en proie à une oppression. Si en ce moment on lui applique le thermomètre, on constate que sa température est très élevée 40°, 41°, même plus, signe unique qui, dans cette période initiale, puisse d'une façon tangible nous démontrer les troubles morbides existants. Mais cela dure à peine 24 heures et l'animal reprend pour ainsi dire son état normal apparent. »

« Il est difficile de déterminer, même d'une façon approximative, cette période de début, dans les cas spontanés, jusqu'à l'apparition des symptômes plus significatifs. Un jour, on s'aperçoit que le train postérieur est paresseux, le pas hésitant; enfin un léger trouble est sur le point de s'installer dans la marche de l'animal. Plus tard, cela s'accuse davantage; le cheval traîne visiblement ses jambes de derrière et le bord du sabot rase le sol; au repos, rien ne fait penser à l'existence d'une affection chez la bête, si ce n'est sa maigreur excessive ; mais aussitôt qu'on l'excite à marcher, elle s'avance en chancelant, la croupe se balançant à droite et à gauche, créant ainsi le signe le plus essentiel qui caractérise extérieurement l'affection et auquel on doit la dénomination de Mal de Caderas (maladie de la croupe) dans le langage des éleveurs.

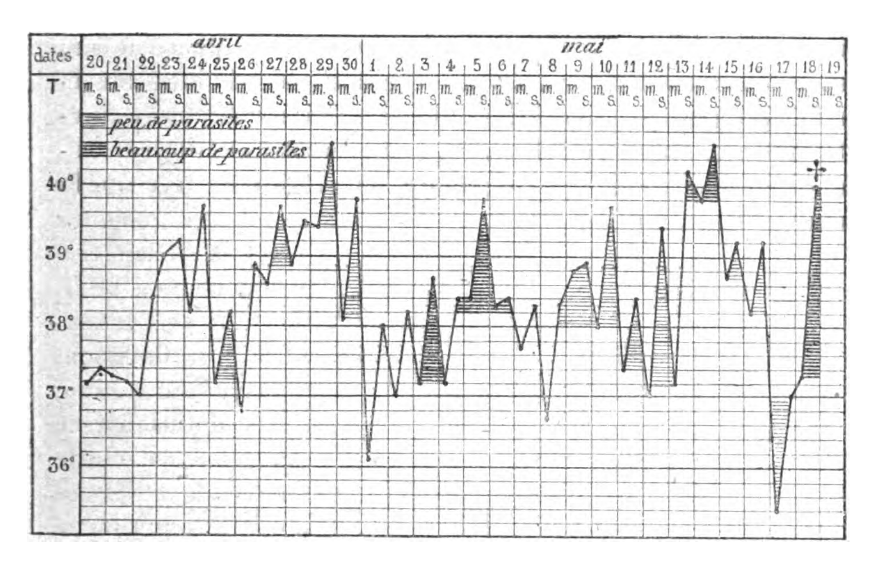
« Dans une période plus avancée de l'affection, les troubles que nous venons de signaler s'accusent de plus en plus, il arrive un moment où la station debout devient impossible. Si l'animal se trouve dans une écurie, par sa tête et par sa croupe il cherche un point d'appui que ses membres lui refusent; s'il est en plein air, ses efforts restent inutiles ; en vain il écarte ses

jambes de derrière, de devant, pour augmenter sa base de stabilité, il reste quelque temps chancelant sur ses membres et finit par tomber. S'il se relève, c'est pour retomber après quelque temps.

« La mort ne suit pas toujours la chute; il arrive que si l'on nourrit bien l'animal, la vie se prolonge encore quelques jours. Pour les animaux vivant en plein champ, livrés à la merci du hasard, l'inanition et la soif précipitent le dénouement fatal. Mais quelles que soient les conditions de nourriture de l'animal tombé, la maladie évolue et les parésies primitives finisssent par se généraliser; à ce moment l'animal est couché sur le côté, la tête et l'encolure allongée, et reste ainsi étourdi jusqu'à ce que la mort arrive. De temps en temps, il fait quelques efforts pour relever la tête, pousse quelques gémissements, agite ses membres, mais fatigué, épuisé, revient à sa position antérieure. Bientôt apparaît l'état comateux, lequel est parfois tellement profond et dépressif qu'il est difficile à l'observateur de le distinguer de l'agonie. Cela dure encore quelques heures ou deux à trois jours, et aboutit invariablement à la mort. Les cas de guérison seraient exceptionnels, et, pour notre part, il ne nous a pas été donné d'en constater.

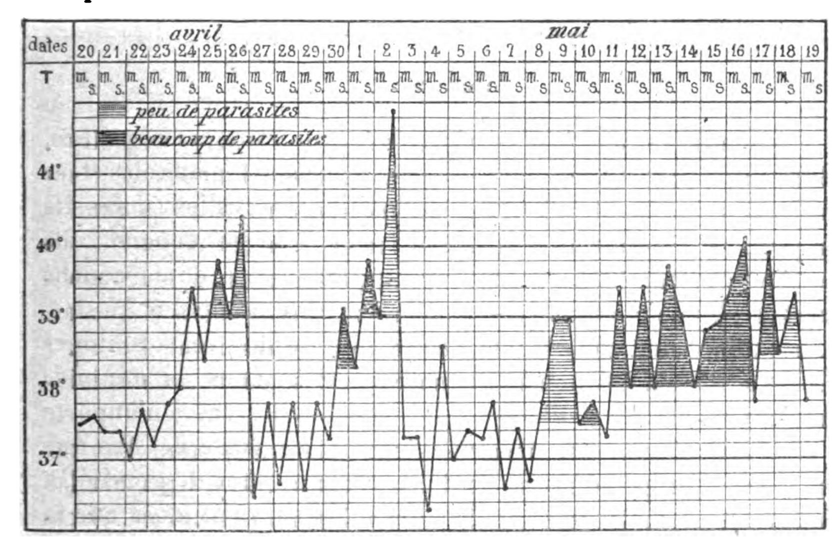
« La fièvre est un élément des plus importants du tableau clinique du mal. Sa courbe affecte une intermittence régulière, tout au moins au début, avec des rémissions matinales très accusées, et vers la fin, elle présente des intervalles successifs de paroxysme très manifestes, bien que, à cette époque, elle revienne rarement à la normale. Le maximum de la courbe peut atteindre 40°,41°, voire même 41°,8 et le minimum 35°,34°. D'une façon générale, la température de l'animal reste toujours élevée, sujette à des recrudescences périodiques, si minimes qu'elles soient, et la mort survient suivant les cas à n'importe quelle période de la courbe thermique. Il est juste de dire que lorsque la maladie ne revêt pas certaines formes de gravité et surtout si elle évolue lentement, la mort survient alors que la température oscille entre 38°,5 et 39°. Voici quelques tracés thermiques dont chacun répond à un type particulier.

« La sécrétion urinaire est presque constamment altérée et présente des troubles dont les plus importants sont l'albuminurie et l'hématurie. Dans les premiers jours de l'affection, les



Observation 5

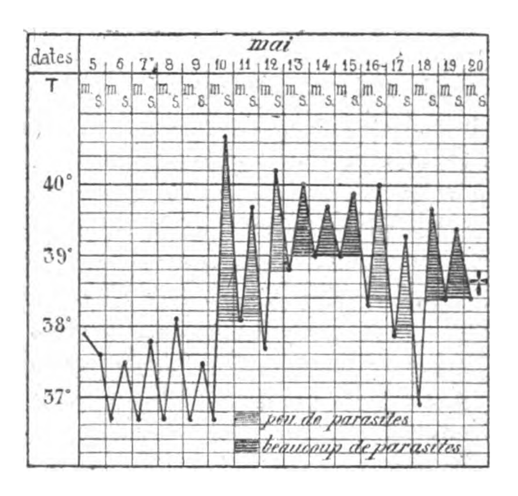
urines sont chargées, fortement colorées en jaune; elles ont l'aspect huileux ou laiteux, et elles contiennent de l'albumine en



Observation 6.

proportion variable suivant les lésions des reins toujours constantes. L'hématurie, d'habitude très discrète acquiert, parfois des proportions telles que les urines paraissent du sang pur; jamais

il ne nous a été donné de constater la présence des parasites spécifiques dans les urines. En dehors de ces altérations chimiques et physiques des urines, il y en a d'autres de nature fonctionnelles, comme la pollakurie, par exemple, qui est très fréquente et qui semble provoquée par une légère irritation de la muqueuse vésicale.



Observation 9.

« La peau est parfois le siège d'une éruption légère exsudative. Sur l'encolure et sur la croupe, on observe alors des plaques isolées, d'une étendue de 3 à 4 centimètres, au niveau desquelles la peau est légèrement épaissie et irritée, rougeâtre, crevassée et traversée par des lignes hémorragiques sèches, le tout recouvert le plus souvent de croûtes peu épaisses et peu adhérentes. Les plaques sont très clairsemées de poils ou absolument nues. » Les coatis inoculés présentent souvent des plaques d'alopécies analogues.

« Nous n'avons pas observé, ainsi qu'il arrive dans d'autres maladies à trypanosomes, d'œdèmes cutanés. Il y a parfois des infiltrations, mais ce sont de véritables transsudations sous-cutanées, qui sont plutôt localisées sur les membres que sur le tronc. Elles siègent de préférence au niveau des articulations. Ces infiltrations sont passagères, fugitives et ambulatoires ; elles disparaissent en aussi peu de temps qu'elles ont mis pour apparaître et quittent une région pour se localiser sur une autre.

Une des régions préférées de cette transsudation est la partie déclive de l'abdomen, la face interne des cuisses; mais, je le répète, elles y sont plus rarement observées que sur les membres. »

Pour terminer cette description résumée du Mal de Caderas spontané chez le cheval, dans sa forme la plus commune, il nous reste encore à dire quelques mots des symptômes oculaires qui, par leur fréquence, présentent quelque intérêt.

Les paupières sont souvent le siège, surtout au début, d'un œdème assez prononcé, accompagné suivant son intensité de chémosis, de conjonctivite; dans ce cas un abondant écoulement muco-purulent s'échappe par les yeux.

En outre, il n'est pas rare de constater sur la cornée des taches laiteuses de dimension variable, à bords irréguliers mal limités, localisées plutôt dans la partie inférieure de cet organe. Anatomiquement considérées, ces taches sont le résultat d'une kératite interstitielle diffuse, intéressant surtout les parties antérieures et superficielles de la membrane qu'elles atteignent; toujours fugaces, toujours bénignes, ces altérations disparaissent sans laisser de traces de leur évolution. L'hypopyon encore assez rare est rapidement résorbé. Et on reste étonné de voir ce cortège imposant de troubles oculaires apparaître et disparaître en si peu de temps (quelques jours) et présenter une bénignité si remarquable.

Il y a peu de signes à noter du côté des voies respiratoires et digestives. Pendant seulement les quelques heures ou les quelques jours qui précèdent la mort, la dyspnée apparaît intense et continuelle; c'est probablement à elle qu'est due l'agitation dont est secoué l'animal pendant toute la durée de l'agonie. L'état oppressif de la respiration n'est manifeste durant le cours de l'affection que lorsque la température dépasse 40°.

L'appétit est conservé; la bête ne cesse de manger jusqu'au dernier jour de sa vie. Parfois il y a des troubles digestifs : *irritation* de la muqueuse intestinale, accompagnée d'expulsion par le rectum d'un liquide comme du blanc d'œuf battu; d'autres fois, diarrhée persistante. Mais ce qui est plus saillant, c'est la paralysie progressive du sphincter anal, de la vessie, qui détermine naturellement l'incontinence des matières fécales et des urines.

Les troubles circulatoires se traduisent durant la vie par

l'accélération du pouls aux moments paroxystiques de la fièvre, et l'anémie profonde qui fait pâlir la conjonctive, la pituitaire et la muqueuse buccale de l'animal.

Quelle est la durée de cette forme naturelle du mal, de son incubation, de sa période paralytique? Il est difficile de répondre même approximativement. Le début de l'affection est peu bruyant, elle ne se signale à l'attention que par des signes peu saisissables (surtout pour les campagnards), tels, par exemple, que fièvre, tristesse, anorexie légère, etc. On ne s'aperçoit de l'existence du mal que lorsque l'amaigrissement et les troubles locomoteurs deviennent manifestes. Mais, à cette époque, l'affection touche presque à sa fin; partant, il est presque impossible de résoudre par observation directe les questions posées. — D'après le dire des éleveurs et nos propres investigations, nous pouvons avancer, néanmoins, qu'un cheval chez lequel commencent à peine à se manifester des symptômes de parésie peut mourir entre 8 jours et un mois ou deux, exceptionnellement plus. Quant à la période d'incubation et à la durée totale de la maladie spontanée, nous préférons ne rien préciser, et, pour en donner une idée approximative, nous référer à la maladie expérimentale dont il sera question un peu plus loin.

***

MAL DE CADERAS CHRONIQUE (OU A ÉVOLUTION LENTE)

Dans les régions fréquemment ravagées par ce fléau, on parle souvent d'une affection du cheval connue sous les noms de *Baacy-poy*, *Baacy-poucou*, ou *Pirou-poucou* (expressions *guarany* qui signifient maladie, ou amaigrissement à longue durée), caractérisée par une émaciation progressive et profonde, donnant à l'animal l'aspect d'une bête momifiée sans provoquer, du moins, pendant des mois, aucun trouble de locomotion. Les éleveurs la considèrent comme une entité à part, n'ayant aucun rapport d'origine avec la flagellose parésiante commune. Mais par une conception bizarre, ils arrivent tout de même à déclarer qu'à la fin, une transformation se produisant, l'animal qui commence par souffrir de Baacy-poy meurt, invariablement, du Mal de Caderas. — Nous avons eu l'occasion d'étudier à plusieurs reprises cette forme à marche prolongée et à symptômes atténués de la maladie connue, et chaque fois nous avons pu

démontrer par voie expérimentale la présence des Trypanosomes spécifiques dans le sang des animaux atteints. Par conséquent, entre ces deux affections prétendues différentes, il ne peut être question que de variétés cliniques.

Le Baacy-poy peut paraître à l'état isolé, ou se montrer sur un plus ou moins grand nombre de bêtes pendant une épidémie de Mal de Caderas; mais le plus souvent il règne à l'état épidémique, c'est-à-dire que dans une région dévastée, tous les sujets malades se présentent sous un même aspect clinique. A tel point que quand on y arrive pour se livrer à quelques études, on est frappé de l'homogénité des symptômes qui existent chez tous les infectés en général. S'il nous a été difficile d'établir, dès les premiers jours de la maladie, la description clinique d'un cas de Mal de Caderas commun, à cause des raisons exposées plus haut, il est encore plus difficile de le faire quand il s'agit de la forme Baacy-poy.

En effet, dans cette forme, le début est plus insidieux, les signes extérieurs plus atténués (tout au moins au commencement) et la durée plus longue. Nous ne pouvons donc que résumer ici les notes prises sur les champs d'épidémies, relatives à l'histoire clinique de cette forme particulière de flagellose, et y ajouter le compte rendu de quelques expériences de contrôle, effectuées dans le but d'éclairer le côté bactériologique et anatomo-pathologique de la question. Le tout, à défaut d'une description détaillée, pourra permettre de se faire une idée plus ou moins concrète du *Baacy-poy* sous ses différents points de vue.

Lorsque cette forme chronique du mal commence à envahir une propriété qui contient des milliers d'équidés, on ne s'en aperçoit que lorsque tous sont déjà sous le coup de l'infection. Un beau jour, on note que l'émaciation des bêtes, qu'on supposait se produire par une foule de circonstances, prend des proportions inquiétantes. Les grandes chaleurs, la sécheresse qu'on a pu un moment incriminer sont suivies par la pluie, par la saison d'hiver, sans que la moindre amélioration se produise dans l'état général des troupeaux; et enfin les animaux commencent à mourir les uns après les autres, après avoir titubé pendant quelques mois.

La mort sera aussi fatale dans ce cas que dans la forme

commune du mal, et toute la population équine disparaîtra, sans exception aucune.

Isolons quelques chevaux malades et observons-les. D'abord nous trouverons que les malades, malgré leur état dépressif accusé, sont encore suffisamment maîtres de leur train postérieur. Leur démarche est presque normale. C'est à peine si on les voit légèrement tituber après plusieurs minutes de trot ou de galop. Si on les garde au laboratoire, ils pourront y vivre encore des mois avant que les altérations de l'allure soient manifestes.

De temps à autre, on notera de vastes œdèmes dans les parties déclives du ventre, de l'albumine et du sang dans les urines, et des troubles de réfraction aux yeux.

La courbe thermique est très instructive. La température de l'animal oscille entre 37°,5 et 38°; rarement elle dépasse 39°. Par conséquent, si peu accusé qu'il soit, il y a un état fébrile, avec paroxysmes et rémissions, qui à la fin du reste disparaissent complètement, pour laisser à l'animal une ligne thermique presque droite.

L'examen du sang au microscope ne révèle pas la présence de Trypanosomes — du moins, pour notre part, jamais nous n'avons pu faire pareille constatation. Il nous a été cependant toujours facile de prouver le pouvoir infectant de cette tumeur par la voie d'inoculation, soit directement du cheval à cheval, soit à une espèce sensible quelconque.

Les parésies, pour être tardives, n'en sont pas moins manifestes, typiques. Elles sont, ici, plus prononcées, plus caractéristiques qu'ailleurs. On dirait même que ce symptôme, pour avoir mis plus de temps a se produire, est devenu plus complet et plus classique dans sa manifestation. Les parésies sont plus lentement progressives, plus fines dans leurs détails, et toutes différentes des autres, précoces, à évolution rapide, parfois même frustes, ce qui du reste a amené divers auteurs à dire que les phénomènes paralytiques manquent souvent ou qu'ils n'apparaissent que pendant quelques heures avant la mort. Rien de plus inexact. Dans les maladies spontanées, elles durent, nous l'avons dit, plusieurs jours ou plusieurs semaines. Cette différence d'opinion provient peut-être de ce que tous les auteurs qui se sont occupés du Mal de Caderas n'ont dû étudier que la

maladie expérimentale, forcément plus grave, plus rapide, où les parésies peuvent être à peine ébauchées, sans que cela soit cependant la règle.

Les conditions pathogéniques exactes de cette forme chronique nous échappent totalement, et nous ne saurions avancer que la cause en soit une atténuation notable du parasite, non plus que des circonstances diverses, plus en rapport avec le mécanisme de défense du cheval, interviennent dans sa production. Un fait expérimental très suggestif dans cet ordre d'idées est le suivant : lorsqu'on injecte à un cheval sain le sang, apparemment non peuplé, d'un cheval qui a le Baacy-poy en aussi minime quantité qu'on voudra, ce n'est pas cette dernière forme qu'on produira, mais bien une forme expérimentale commune, celle qu'on en obtient en partant d'un cas spontané aigu.

Exactement une semaine après, les Trypanosomes apparaîtront dans le sang du cheval inoculé, aussi abondants, aussi virulents (pour les singes) que d'habitude. Il n'y a rien là qui puisse favoriser l'hypothèse d'une atténuation dans la pathogénie du Baacy-poy.

Rapprochons un autre fait du précédent : si l'on inocule un cheval sain avec des Trypanosomes qui ont subi quelques passages à travers des organismes peu sensibles à leur action, comme le coati, le chat, par exemple, on provoquera de la sorte une infection expérimentale dont le début sera peut-être à peine atténué ; mais, dans la suite, l'atténuation s'accusant davantage, on aura sous les yeux tout le tableau clinique de la maladie chronique spontanée, c'est-à-dire la forme caractéristique des parésies avec maintien de la température à 38° (avec à peine une rémission matinale) et disparition apparente des Trypanosomes du sang, ce dernier restant toujours infectieux. La mort peut tarder dans ce cas 5-6 mois, parfois même plus.

Quelle que soit l'interprétation de ces deux faits, nous croyons que dans les conditions naturelles de la pathogénie du Baacy-poy il y a plus d'un point encore obscur pour nous. Cette modalité si bizarre serait-elle due à une forme évolutive encore inconnue du parasite ? Ce n'est là qu'une simple supposition.

***

LÉSIONS INTERNES

Lorsqu'on ouvre un cheval ayant succombé au Mal de Caderas, la première constatation qu'on fait, c'est l'existence d'une quantité plus ou moins grande, suivant la gravité des cas, d'un exsudat séro-fibrineux qui occupe les cavités séreuses suivantes, rangées par ordre de prédilection : péritoine, plèvre, péricarde et même synoviales articulaires (dans le cas où il existe des localisations exsudatives au niveau des grosses jointures). Cet exsudat est transparent, jaune citrin, rarement louche; il contient des leucocytes mono — et polynucléaires peu nombreux, jamais nous n'y avons noté de parasites spécifiques. Toutes ces séreuses sont légèrement irritées et présentent à leur surface une arborisation vasculaire peu marquée. La dilatation des petits vaisseaux et des capillaires paraît être un des phénomènes les plus constants de l'action de ces Trypanosomes ou de leurs sécrétions sur le système circulatoire périphérique.

Tous les organes internes glandulo-vasculaires comme le foie, la rate, le pancréas, sont fortement injectés, turgescents, d'aspect foncé, et laissent noter une certaine tuméfaction. Celle de la rate surtout est très notable.

Le système lymphatique n'est pas moins atteint; cela se voit surtout au niveau des ganglions lymphatiques, engorgés, hypertrophiés, pulpeux, quelques-uns même rougeâtres (ganglions mésentériques). Ils révèlent au microscope une dilatation vasculaire avec des Trypanosomes, si l'animal est mort en en présentant beaucoup dans le sang; semblables constatations sont faites dans la rate.

Mais il semble que les lésions les plus saillantes après les altérations diverses du sang sont celles localisées dans les reins, presque toujours constantes. Dans les cas graves et chroniques, elles sont même de règle. L'expression générale de ces lésions est une hémorragie interstitielle diffuse, avec néphrite parenchymateuse, aiguë ou chronique, suivant les cas. L'hémorragie, parfois abondante, siège tout le long des tubes urinifères, plus spécialement des tubes contournés et des anses de Henle; au niveau des glomérules, elle est discrète, et elle n'envahit qu'exceptionnellement la capsules de Bowman.

Les cellules glandulo-épithéliales sont le siège d'altérations

mécaniques dues à la compression considérable provoquée par les amas de sang extravasé autour des tubes. Cette compression peut même produire sur plusieurs points, depuis le glomérule jusqu'au bassinet, l'oblitération complète de leurs lumières, et y arrêter le cours du liquide circulant. L'accumulation de l'urine en amont de ces points est la cause naturelle des dilatations qu'on y observe et des altérations irritatives des cellules parenchymateuses qui ne tardent pas à se produire. Tous ces troubles sont traduits sur les coupes par un déchiquètement des bords libres des cellules parenchymateuses, ou, à certains endroits, par leur entière destruction et par une grande quantité de détritus cellulaires qui encombrent l'intérieur des tubes, sous forme d'amas de substances amorphes. Toutes ces lésions nous expliquent très bien l'existence durant la vie chez le malade d'une altération chimique et physique des urines (albumine, sang, cellules rénales, etc.).

A la section transversale des reins, on distingue facilement les régions où siègent de préférence les foyers hémorragiques; ces régions sont en rouge foncé et se trouvent au niveau des pyramides de Malpighi, Ferrein, et tout le long de la *voûte artérielle* des reins. Rien à la surface de l'organe.

Presque rien à noter comme lésions pour le système nerveux central. Exsudat gélatineux citrin insignifiant dans le canal rachidien entre dure et pie-mère, encore que peu constant. Les surfaces internes de ces deux enveloppes membraneuses peuvent être légèrement irritées ou franchement injectées. Sur les masses cérébrale et médullaire, on trouve un piqueté discret, lequel, avec quelques caillots minuscules sous-arachnoïdiens, est la seule altération macroscopique des centres nerveux digne de mention.

Les variations quantitatives et qualitatives, que le sang présente chez les animaux atteints de l'infection que nous étudions, sont certainement, entre toutes, les plus intéressantes et aussi les plus caractéristiques. Il y a d'abord à constater la diminution progressive du nombre des hématies, jusqu'à la moitié ou le quart du type normal; il y a ensuite la perte en hémoglobine que subissent les globules rouges, qui deviennent d'une couleur jaune pâle.

Ces altérations profondes de la masse sanguine se reflètent à

l'extérieur de l'économie surtout par l'aspect livide des muqueuses, comme nous l'avons dit plus haut (gencives, conjonctive et pituitaire).

Les troubles oculaires ont déjà été mentionnés; ils présentent trop peu de gravité pour pouvoir créer de lésions importantes durables.

Les voies respiratoires sont légèrement irritées et couvertes d'un peu de sécrétion muqueuse ou muco-purulente. Durant la vie, elle coule par les narines et fait penser à la gourme.

L'état emphysémateux des poumons qu'on observe parfois sur les cadavres est, sans aucun doute, dû à la dyspnée intense qui règne vers la fin de la vie.

*
* *

FORME SPASMO-PARALYTIQUE DU MAL DE CADERAS

Dernièrement, nous avons eu l'occasion d'étudier un cas de Mal de Caderas où une série de phénomènes nerveux, de nature spasmodique, ont compliqué d'une façon particulière le cadre clinique de cette affection. Ce qui a caractérisé surtout cette forme bizarre, c'est d'une part l'apparition au début de quelques contractions musculaires tout à fait insolites dans l'espèce : c'est de l'autre la coexistence, avec des Trypanosomes connus, de formes parasitaires d'une structure qui, de prime abord, les rapproche des algues.

Nous résumons cette observation ainsi qu'il suit ;

Le 10 mars 1902, on trouve, près de Paraguay, à l'*estancia* de M. V. V., deux chevaux dont la maigreur, peu accusée du reste, fait soupçonner chez eux le Mal de Caderas, déjà à cette époque assez répandu aux environs. Un mois après nous arrivons sur les lieux pour établir un diagnostic et nous trouvons les animaux isolés dans un enclos. En dehors de la légère émaciation, rien ne fait supposer chez eux l'évolution d'une infection quelconque. La température est pour l'un 37°,6 ; 37°,8 pour l'autre. Et le sang, malgré l'examen attentif avec lequel on l'étudie au microscope, paraît chez l'un comme chez l'autre dans un absolu état de stérilité. Rien à noter non plus dans la marche qui s'observe normale chez tous les deux, sauf une très légère débilité du train postérieur, visible seulement après un galop de plusieurs minutes.

L'un deux est amené à l'Institut, et l'observation se continuant, nous nous assurons enfin de la nature trypanosomique de l'affection, soit par voie d'inoculation, soit aussi par l'apparition quoique tardive, des Trypanosomes spécifiques dans le sang de l'animal. En effet, depuis le 10 jusqu'au 15 mars, le sang de ce dernier est resté dans un état apparemment non peuplé ; il l'a été probablement depuis qu'il est soupçonné malade, car on ne peut comparer ce laps de temps relativement long avec les intervalles courts où le sang, dans les cas de Mal de Caderas commun, reste non peuplé. La nature faiblement infectieuse du sang chez cet animal est mise plus en relief par une inoculation à un singe. Il en est introduit 7 gouttes sous la peau d'un miriquinas de petite taille. Les Trypanosomes ne font leur apparition dans le sang chez ce dernier que 11 jours après, alors que dans d'autres cas c'est entre le 3e et le 4e jour de l'inoculation. Jamais chez le singe la maladie expérimentale ne dure plus que 8-10 jours ; dans le cas présent, elle a duré 16 jours.

Pendant que le sang du cheval se montrait dépourvu de Trypanosomes, d'autres formes parasitaires, avons-nous dit, y ont été constatées : ce sont d'énormes cellules allongées, pointues à un bout, rectangulaires ou arrondies à l'autre. Colorées par l'hématéine-magenta, elles se présentent sous formes de minces rubans auxquels on aurait effilé une extrémité. Elles mesurent à peu près 60 μ de long et 8 à 10 μ de large. La membrane est nettement dessinée, les noyaux au nombre de 5-6 sont de forme carrée, les uns plus petits que les autres, et ils sont en ligne à l'intérieur du parasite, de façon que les plus petits correspondent à son bout pointu et les plus volumineux à l'autre, large. Entre deux noyaux ainsi qu'entre ces derniers et la membrane, il reste un espace clair, étroit, à peine teinté en rouge, c'est le protoplasma de la cellule parasite.

A côté de ces formes on en voit d'autres plus petites, carrées ou rondes, contenant un gros noyau qui fixe bien l'hématéine, entouré d'une mince portion de protoplasma coloré en rouge par le magenta. La safranine, le bleu Borrel-tannin donnent une coloration avec mêmes détails morphologiques.

Pour ce qui concerne l'état général de la bête, nous devons relater enfin les phénomènes nerveux qui se sont installés chez elle dès qu'elle a été dans notre laboratoire, et, chose curieuse,

ont précédé de plusieurs jours les symptômes classiques du Mal de Caderas.

Dès l'abord, elle présentait peu d'appétit. De temps à autre on le trouvait la bouche pleine d'écume. Cherchant à en pénétrer la cause, on n'a pas tardé à voir que la bête avait un léger trismus, ce qui l'empêchait de manger et de boire. Ce trismus n'a pas été permanent, et grâce à cela l'animal pouvait s'alimenter, quoique mal. Cependant l'amaigrissement fut rapide. Le 14 mars, le matin, le cheval eut une espèce d'attaque épileptiforme. Il était dans un calme apparent quand tout à coup il a commencé à présenter une série de contractures involontaires, seyant dans les muscles de la face, de la tête et de l'encolure, provoquant la déviation de toutes ces parties vers le flanc gauche. Dans cette situation il avait la tête fortement étendue en avant et la bouche effleurait les côtes comme s'il cherchait à se gratter. La face de l'animal avait complètement changé d'expression : la bouche pleine d'écume, les yeux saillants, les oreilles baissées en arrière lui donnaient l'aspect d'un fauve qui s'apprête à se jeter sur un agresseur qui le suit.

Durant l'accès, l'animal ne cessait pas de mâchonner et une salive épaisse et mousseuse produite par les mouvements de déduction des mâchoires s'échappait d'entre les lèvres. La langue n'était pas à l'abri des spasmes : on la voyait ramassée et tordue sur elle-même, et la pointe étirée se portait convulsivement du côté où convergent toutes les contractures. Les lèvres aussi étaient contracturées. Relevées et convulsées vers la commissure gauche, elles étaient le siège de mouvements incessants comme ceux exécutés pendant la préhension des aliments. L'ensemble de l'état spasmodique des lèvres, des mâchoires et de la langue était pareil aux mouvements combinés de ces organes dans un cas où l'animal, ayant une épine plantée dans la bouche, chercherait sans y parvenir à s'en débarrasser.

Pendant toute la durée de l'attaque, les contractures de l'encolure de la tête et de la face persistaient, mais de temps à autre elles augmentaient d'intensité, soit alternativement, soit simultanément. Par exemple, à un moment donné, l'animal arrivait à écarter légèrement sa tête de ses flancs, la baissait, la relevait, en cherchant une meilleure posture, mais soudain les contractures, reprenant la déviation vicieuse, se réalisaient.

à nouveau. On aurait dit qu'il y avait des accès subintrants durant une seule attaque.

Elle dure 5-10 minutes et se répète 4-5 fois en 24 heures. La nuit, le nombre des attaques est moindre que dans la journée. Pendant et après les attaques, la température de l'animal ne varie pas, et, en dehors du trismus qui persiste, tout disparaît. Pour corriger la déviation de son encolure, le cheval tourne souvent sur lui-même; mais, vite pris de vertige, il tombe par terre et y reste, sans perdre la connaissance, jusqu'à la fin de la crise.

Cet état de choses a duré, parallèlement avec l'absence des Trypanosomes dans le sang, jusqu'au 25 mars, époque où ces derniers ont fait leur apparition et où les phénomènes nerveux ont complètement cessé. A partir de ce jour, le Mal de Caderas évoluait chez la bête dans sa forme la plus classique; la mort est arrivé spontanément le 10 avril. — Jusqu'à cette date les formes parasitaires curieuses dont nous avons parlé n'ont jamais manqué dans le sang.

En résumé, ces phénomènes spasmodiques n'ont paru dans ce cas que comme des symptômes préliminaires dans la marche et l'évolution générale de l'affection; car au fur et à mesure que les manifestations paralytiques devenaient chez l'animal plus apparentes, les signes d'excitation cérébro-spinale allaient s'atténuant pour enfin complètement disparaître.

En présence de cette modalité insolite du Mal de Caderas et de la coincïdence des formes parasitaires non moins curieuses dans le sang du même malade, quelle interprétation paraît la plus rationnelle? Ne pourrait-on penser à la superposition, dans ce cas, de deux infections, l'une occasionnée par les Trypanosomes spécifiques ordinaires, et l'autre par les formes parasitaires relatées, lesquelles produiraient les symptômes surajoutés. Mais alors l'inoculation du sang de ce cheval à d'autres, sains, devait produire les mêmes infections superposées. Il n'en est rien. Chaque fois que nous nous sommes mis dans ces conditions d'expérience, nous n'avons pu produire que le Mal de Caderas, dans sa forme la plus vulgaire. Il en fut de même aussi chez les singes, rats, souris, etc., auxquels on avait inoculé du sang de cheval; excepté peut-être chez un coati inoculé de la même façon, qui est mort avec un léger opistho-

tonos; mais, ici même, il nous a été impossible d'établir en série l'infection du premier coati avec toutes ses complications spasmo-médullaires. De sorte qu'il est difficile de répondre affirmativement à la question énoncée plus haut. Reste l'hypothèse, toute simple, d'une nouvelle forme de Mal de Caderas, présentée par ce cas, une forme *spasmo-paralytique* dans laquelle les formes parasitaires n'auront aucune part pathogénique, mais un rôle entièrement passif; comme celui des *filaires*, par exemple, que tant de fois nous avons trouvées dans le sang à côté des Trypanosomes, soit chez le cheval, soit chez les animaux du laboratoire, sans qu'ils eussent en rien troublé la marche de la maladie. Nous signalons ces faits sans commentaires, car nous pensons que d'autres observations et d'autres expériences sont nécessaires pour résoudre définitivement la question.

***

ESPÈCES SENSIBLES

En dehors des espèces spontanément atteintes, comme le cheval, le mulet et l'âne, bien d'autres mammifères sont réceptifs, vis-à-vis du Mal de Caderas; en voici la liste, en commençant par les plus sensibles.

Singe (*Nictipithecus felinus* de Spix). — Incubation de 3 à 5 jours; durée de l'affection, 5 à 8 jours, rarement plus. Prodigieuse multiplication des Trypanosomes dans le sang.

Souris blanche et grise. — Aussi sensible que le singe; durée de l'affection, 5-8-12 jours. Multiplication énorme des Trypanosomes.

Rat blanc. — Très sensible, énorme quantité de Trypanosomes dans le sang.

Carpincho (*Hydrochœrus capibara*). — Incubation 10 jours. Durée de la maladie, 1 ou 2 mois, rarement plus; il présente des phénomènes paralytiques aux derniers moments seulement.

Cobaye, Lapin. — Peu sensibles. Peu de Trypanosomes dans le sang.

Chien. — Incubation 5-6 jours. Peu de Trypanosomes dans le sang, mais reproduction typique des symptômes paralytiques du Mal de Caderas.

Chat. — Multiplication peu nombreuse des parasites dans le sang, guérison ; les jeunes succombent facilement.

Mouton, Bœuf. — Réfractaires. Pas de multiplication des Trypanosomes dans le sang ; toutefois ce dernier reste infectieux pour la souris pendant au moins 2 mois (Lignières).

Porc. — Réfractaire ; mais il présente le sang infectieux plusieurs semaines après l'inoculation (Lignières).

Oiseaux. — Absolument réfractaires.

Le 29 octobre 1902.
Assomption (Paraguay).

Au moment d'écrire ces dernières lignes, nous avons reçu par le courrier de Buenos-Ayres un gros volume intitulé : *Le Surra américain* ou *Mal de Caderas,* publié par F. Sivori et E. Lecler, dans les *Anales des Ministerio de Agricultura,* tomo 1, Num. 1. Octobre 1902. — Buenos-Ayres.

Ces auteurs ont repris la question du Mal de Caderas et l'ont étudiée sous toutes ses faces. Ils arrivent, ou presque, aux conclusions connues et publiées sur la question avant leur publication. Nous y relevons seulement deux points,qui sont du reste les seules parties originales de cette volumineuse publication :

1° Pour ces auteurs, le *Mal de Caderas* n'est que le *Surra* des Indes, importé ou étendu jusqu'à l'Amérique du Sud (on ne sait comment ; ils ne le disent pas). Cette identité est basée pour eux sur une analogie présumée des caractères morphologiques des Trypanosomes des deux affections. Ils ont eu entre les mains du sang de cheval *nagané*. Le Trypanosome de ce dernier et celui du Mal de Caderas ne sont pas, disent-ils, morphologiquement différents. D'autre part, pour eux comme pour R. Koch, il y a identité entre Nagana et Surra, il y a identité aussi, par conséquent, entre Surra et le Mal de Caderas. Comme argumentation, on le voit, cela laisse un peu à désirer. La tendance actuelle est plutôt pour une opinion contraire. M. J. Lignières a donné les raisons sur lesquelles est basée cette tendance ; jusqu'à meilleure preuve du contraire, cette thèse reste la seule valable[1] ;

2° Pour Sivori et Lecler, le Mal de Caderas est transmis d'un animal à l'autre par l'intermédiaire de mouches, la *mosca brava*

1. Voir à ce propos Laveran et Mesnil, Le Nagana et le Mal de Caderas sont deux entités morbides bien distinctes, *Comptes Rendus Ac. d. Sciences,* 17 novembre 1902. — N. D. L. R.



(*Stomoxys calcitrans* L.) et le *taon*. En faisant piquer tour à tour par ces diptères des chevaux malades et d'autres sains, ces auteurs sont arrivés à transmettre l'affection des premiers aux seconds.

M. Lignières n'a pas vu un seul cas de contagion naturelle dans son laboratoire, où les chevaux en expérience et les chevaux sains se trouvaient côte à côte, et où les *mosca brava* ne faisaient pas défaut. Et pourtant ces dernières recueillies sur les chevaux malades présentaient dans leur tube digestif des Trypanosomes vivants qui, injectés aux espèces sensibles, provoquaient la mort.

Nous-mêmes avons été les premiers à signaler, depuis 1901, que, dans la transmission naturelle du Mal de Caderas, les insectes ailés ne peuvent avoir aucun rôle actif. Nous avons déjà dit ailleurs que nous avons gardé pendant des mois des chevaux infectés et d'autres sains dans la cour de notre laboratoire, sans jamais être témoins d'un cas de contagion. Ce ne sont pas les *mosca brava* et les taons qui manquaient. Il y a là contradiction entre les observations de Sivori et Lecler d'une part, et celles de J. Lignières et les nôtres, d'autre part.

Dans l'estancia [1] de M. V. V., près de Paraguary, on fait l'élevage des bovidés et des équidés. Depuis 1896, que M. V. V. l'a achetée, il n'y a jamais observé un cas de Mal de Caderas. En 1901, la maladie fait irruption dans un *portrero* (division de champs entourés par des fils de fer tendus horizontalement sur une hauteur de un mètre) où il y a des *carpinchos* à cause d'une petite rivière qui le traverse. En effet, au mois de janvier de 1901, on s'aperçoit qu'une trentaine des 60 chevaux qui y sont enfermés sont atteints de Mal de Caderas. On sépare les malades et on les isole. Sur les 30 animaux sains qui restaient, 4 encore deviennent malades. Ces 34 malades meurent les uns après les autres dans un espace de temps de 6 mois. Un portrero limitrophe de celui infecté contient 300 têtes d'animaux équidés, lesquels ne sont séparés des infectés que par quelques lignes de fil télégraphique. Les animaux situés des deux côtés de cette barrière peuvent venir en contact. *Eh bien, pas une des trois cents bêtes du second champ, exposées aux piqûres de mouches de toute espèce pendant 6 mois, n'a pris la maladie.* Nous avons été sur

1. *Estancia*, vaste propriété où on fait l'élevage

les lieux et nous avons trouvé des taons, des *mosca brava*, des moustiques et d'autres insectes ailés qui piquent les chevaux au sang. Peut-on expliquer avec la théorie Sivori-Lecler pourquoi dans ce cas les mouches n'ont pu transmettre l'infection? — Après la mort des chevaux malades, le Mal de Caderas disparaît complètement de la propriété et ne réapparaît qu'en 1902, au mois de février, dans un portrero situé dans un coin de l'estancia, portrero qui n'est pas limitrophe avec celui où on avait isolé les malades. Mais il est traversé par une rivière où abondent les carpinchos. Sur 100 chevaux enfermés là, il ne se produit que 3 cas qu'on isole. Mais on sait bien qu'avant que les symptômes typiques du Mal de Caderas apparaissent, le sang est déjà peuplé; pourquoi donc les mouches n'ont-elles pas infecté par leurs piqûres les animaux restants?

Il y a même plus : lorsque le nombre d'animaux d'un lot n'est pas trop élevé, les éleveurs laissent les malades et les sains ensemble dans un portrero retiré. Il arrive quelquefois qu'après plusieurs mois la mortalité cesse et que quelques-uns d'entre eux restent indemnes. Comment ces chevaux ont-ils échappé à la contagion, car nous savons qu'il n'y a pas de guérison pour cette affection? — Voilà des faits précis qui valent bien une expérience. Étant donné que les théories régnantes ne sont pas suffisantes à les expliquer, il en faudra chercher d'autres.

LE BACILLUS SUBTILIS

comme cause de la panophtalmie chez l'homme.

PAR le Dr W. SILBERSCHMIDT

PRIVATDOCENT, ASSISTANT A L'INSTITUT D'HYGIÈNE A ZURICH

(Travail du laboratoire de l'Institut d'hygiène de l'Université de Zurich.)

Une des causes les plus fréquentes de la panophtalmie traumatique de nos régions est la lésion du globe oculaire, due à la pénétration d'un fragment de fer. L'agriculteur ou le vigneron travaillant la terre ressent une douleur en piochant au moment où le corps étranger (c'est le plus souvent un fragment métallique, plus rarement un petit morceau de pierre) perce l'œil pour pénétrer dans le corps vitré, et 24 heures plus tard la panophtalmie s'est déclarée, l'œil est perdu. Il s'agit donc d'une affection très grave du globe oculaire à marche excessivement rapide.

J'ai eu l'occasion d'examiner bactériologiquement le corps vitré dans deux cas de panophtalmie; les résultats obtenus me paraissent être d'un intérêt général.

Le premier cas, observé en juin 1900 à la clinique privée de M. le Dr Th. Baenziger, oculiste à Zurich, concerne un homme d'une trentaine d'années qui s'est blessé en travaillant la terre le 31 mai, vers 4 heures de l'après-midi. Le malade se présente le lendemain à M. le Dr Baenziger; la panophtalmie était déjà si prononcée que tout espoir de sauver l'œil étant illusoire, M. Baenziger se décide à exentérer le bulbe oculaire le 1er juin à 9 heures du soir, soit 29 heures après l'accident. J'ai assisté à l'opération et j'ai pu recueillir aseptiquement par aspiration une partie du corps vitré, de suite après que l'œil avait été enlevé. Je fais sur place une série de préparations microscopiques directes (frottis) et des cultures. La sécrétion purulente de la conjonctive a aussi été examinée.

EXAMEN BACTÉRIOLOGIQUE. — *Cultures de la conjonctive :* quelques colonies de bacilles pseudo-diphtériques et de coccus.

1. Ce premier cas a fait l'objet d'une communication collective avec M. le Dr Baenziger à la réunion de la Société d'ophtalmologie à Heidelberg, en août 1092. (*Bericht der ophtalm. Gesellschaft*. Heidelberg, 1902.)

Examen microscopique direct du corps vitré. — Grande quantité de gros bacilles trapus, à extrémités arrondies, isolés en courtes chaînettes ou en amas irréguliers. Les bacilles ne se colorent pas d'une façon uniforme, quelques-uns présentent des parties plus claires, mais pas de spores; malgré leur pléomorphisme, ils paraissent appartenir à une seule espèce. Comme l'examen direct le faisait prévoir, les diverses cultures du corps vitré, sur gélatine, sur gélose, sur sérum et en bouillon ne n'ont permis de déceler qu'un seul micro-organisme. *Toutes les cultures du corps vitré ont été pures d'emblée;* il s'agit d'un *bacille* dont je vais indiquer brièvement les propriétés.

Aspect microscopique. — Bâtonnets de longueur variable, assez gros, à extrémités arrondies, nettement mobiles dans les cultures jeunes; les bacilles sont très souvent disposés en chaînettes de longueur variable, les formes isolées étant généralement plus longues que les articles des chaînettes. Le bacille se colore assez bien avec les couleurs d'aniline et ne se décolore pas d'après la méthode de Gram. La coloration n'est pas toujours uniforme; on voit parfois une zone claire (capsule?), surtout dans les préparations provenant directement de l'animal. Les cils *peritricha* sont en assez grand nombre; j'en ai compté jusqu'à 12.

Les spores sont nettement ovales; elles occupent le centre du bacille; leur largeur ne dépasse pas celle du microbe; pas de forme en clostridium.

Cultures. — Le microbe en question pousse très bien à l'étuve à 35°, très bien aussi à 22° C.; il est plutôt aérobie, les cultures anaérobies sont maigres. Les spores apparaissent généralement le 3e jour dans les cultures à 35°.

Gélatine. — La gélatine est rapidement liquéfiée; l'entonnoir de liquéfaction, plus large à la partie supérieure, arrive jusqu'au bas de la piqûre; des flocons grisâtres se déposent au fond du tube, d'autres, plus petits, restent en suspension dans le liquide. Dans les cultures sur plaques, les colonies jeunes sont rondes, bordées de courts filaments radiés, visibles seulement au microscope; le 2e jour, la colonie a de 1 à 2 centimètres de diamètre, on y distingue une partie centrale assez dense, une partie moyenne plus claire et la périphérie plus trouble. La liquéfaction est complète, même dans les plaques diluées, en 3 à 4 jours.

Les colonies profondes permettent de reconnaître la structure feutrée; le 1er ou le 2e jour, on distingue très nettement les filaments périphériques se dirigeant dans tous les sens.

Gélose. — Les colonies superficielles isolées sont rondes et le plus souvent à bords irréguliers, déchiquetés. En strie, la culture forme une couche assez épaisse blanc grisâtre, sèche, se détachant facilement; ici aussi les contours sont irréguliers et la culture s'étend sur toute la surface.

Bouillon. — Le bouillon se trouble déjà au bout de 16 à 20 heures de séjour à l'étuve; il s'éclaircit petit à petit en même temps que le dépôt muqueux augmente de volume; la membrane superficielle est humide, très friable et tombe généralement au fond du tube au moindre choc. Pas de différence entre le bouillon sucré et le bouillon ordinaire. Je n'ai pas pu constater de production d'acide.

Pomme de terre. — Couche grisâtre, homogène, assez sèche, prenant parfois l'aspect crémeux, sans replis, sans gouttelettes.

Lait — La peptonisation est déjà apparente le 2e jour; la couche séreuse augmente petit à petit et, au bout d'une quinzaine de jours, il ne reste presque plus de caséum.

Sérum. — Culture en barbe de plume avec liquéfaction assez lente.

Avant de nous occuper de la classification du microbe en question, étudions son rôle dans le corps vitré. Les *expériences sur les animaux*, faites en majeure partie en collaboration avec M. le Dr Baenziger, ont fourni un résultat nettement positif; qu'il me suffise d'en citer quelques-unes. L'œil a toujours été anesthésié au moyen de quelques gouttes de cocaïne à 5 0/0.

14 juin 1900. *Lapin n° 1.* — Inoculation dans le corps vitré par piqûre latérale à travers la sclérotique de 1/10e c.c. environ d'émulsion de culture sur gélose âgée de 48 heures. Le lendemain, *panophtalmie typique :* paupières tuméfiées, forte sécrétion purulente, chemosis de la conjonctive, protrusion du bulbe oculaire, trouble de la cornée, iritis. Ces symptômes diminuent déjà à partir du 2e jour et, 8 jours après l'inoculation, il ne reste, en dehors de l'abcès du corps vitré, qu'un peu d'hypopyon de la chambre antérieure de l'œil.

14 juin 1900. *Lapin n° 2.* — Inoculation d'une émulsion de

même culture dans la chambre antérieure de l'œil. Pas de panophtalmie.

14 juin 1900. *Lapin n° 6.* — Témoin. Injection de bouillon stérile dans le corps vitré. Pas de panophtalmie.

20 juin 1900. *Lapin n° 12.* — Inoculation dans le corps vitré de 1/10e c. c. d'émulsion de culture, sur gélose âgée de 8 jours, en traversant la cornée et le cristallin. Le lendemain, panophtalmie.

3 juillet 1901. *Lapin n° 15. Œil droit.* — Inoculation latérale directement dans le corps vitré de 1/10e c. c. d'une émulsion de culture sur gélose. 8 heures après l'injection, chemosis; le lendemain, panophtalmie.

Œil gauche. — Inoculation sous-conjonctivale de 1/4 c. c. de la même émulsion. 8 heures après l'injection, chemosis; le lendemain, il ne reste plus qu'une légère hypérémie de la conjonctive. Le 2e jour, l'œil gauche est tout à fait normal d'aspect.

3 juillet 1901. *Lapin n° 17. Œil gauche.* — Sclérotomie sous-conjonctivale dans le but d'occasionner un épanchement du corps vitré; immédiatement après, injection de 2/10e c. c. d'émulsion de culture dans la partie prolabée du corps vitré, mais sous la conjonctive. L'après-midi, les paupières sont collées, chemosis. Le lendemain, le chemosis et la sécrétion purulente sont encore prononcés; le globe de l'œil reste normal.

Œil droit. — Sclérotomie sous-conjonctivale sans injection ultérieure. Le lapin est sacrifié le 6 juillet; on ne constate aucune différence entre les deux yeux.

16 juillet 1901. *Lapin n° 22. Œil droit.* — Inoculation latérale directe dans le corps vitré d'une émulsion de culture âgée de 5 jours.

Œil gauche. — Inoculation de la même émulsion dans le corps vitré en traversant la cornée et le cristallin.

Le lendemain, panophtalmie des deux yeux; l'animal est sacrifié le 18 juillet. Le corps vitré a le même aspect dans les deux yeux. Il renferme un pus épais, glaireux, grisâtre.

19 juillet 1901. *Lapin n° 25. Œil droit.* — Inoculation dans la chambre antérieure de l'œil de 2/10e c. c. d'une culture en bouillon, âgée de 20 heures, provenant de l'œil du lapin 22.

Le lendemain, pas d'injection de la conjonctive; la cornée

est claire, l'émulsion injectée apparaît sous forme d'un dépôt trouble, floconneux, dans la chambre antérieure de l'œil.

Œil gauche. — Inoculation latérale dans le corps vitré de la même émulsion. Le lendemain, panophtalmie.

Nous avons obtenu les mêmes résultats en 1902, avec les cultures de 12e génération. Nous avons inoculé en outre deux chiens qui, tous deux, ont présenté une panophtalmie typique après 24 heures. Chez le chien, la perforation du globe de l'œil se produit plus rapidement et plus souvent que chez le lapin.

La description de ces quelques expériences suffit pour nous prouver que, chez le lapin et chez le chien, *l'injection de culture pure du bacille retiré de l'œil humain est suivie de panophtalmie si cette injection a lieu dans le corps vitré.* 6 à 8 heures après l'injection, l'œil est déjà enflammé, la conjonctive hyperémiée, la cornée légèrement trouble; après 18 à 24 heures, les paupières, fortement tuméfiées, restent collées ensemble, la sécrétion conjonctivale est abondante et le plus souvent puru lente, il y a chemosis et généralement protrusion du globe oculaire. La cornée et l'humeur aqueuse se troublent davantage; on constate de l'iritis, et, derrière la pupille, l'abcès du corps vitré se trahit par un réflexe gris ou gris jaunâtre. Les symptômes d'inflammation suraiguë ne durent que quelques jours, la tension du globe oculaire augmentée d'abord, diminue par la suite, la cornée s'éclaircit quelquefois, à moins qu'elle ne se recouvre d'un pannus, l'iritis ne dure pas longtemps, le cristallin reste souvent indemne et la chambre postérieure est remplie d'un pus épais, visqueux, grisâtre. Plus tard, l'œil se ratatine petit à petit. Je ne parlerai pas des lésions de la rétine et de la choroïde.

Il faut, pour produire chez le lapin une panophtalmie telle que je viens de la décrire, que la culture soit injectée dans le corps vitré; une très petite quantité de culture suffit. L'injection sous-conjonctivale n'occasionne que des symptômes de courte durée; le chemosis et l'injection conjonctivale, parfois intenses, disparaissent après 2 jours au plus, l'œil n'en souffre pas. L'expérience du lapin 17 nous montre que l'injection sous-conjonctivale de culture dans le corps vitré prolabé par suite de sclérotomie ne suffit pas pour produire la panophtalmie. Après injection de culture dans la chambre antérieure de l'œil,

les symptômes locaux sont sans gravité et l'œil se *rétablit rapidement.*

Avant de tirer de ces résultats des conclusions générales, je vais relater brièvement le 2e cas que j'ai eu l'occasion d'examiner grâce à M. le Professeur Dr *Haab,* directeur de la clinique ophtalmologique de l'Université de Zurich.

2e *cas.* Une femme d'une trentaine d'années entre à la clinique ophtalmologique de l'Université, le 26 septembre 1902. Dans l'après-midi du 25 septembre, la malade s'était blessée à l'œil droit en piochant la terre. M. le professeur Haab réussit à retirer au moyen de son grand aimant, le fragment de fer qui s'était logé dans le corps vitré le 26 septembre à midi. Afin d'essayer d'arrêter la panophtalmie commençante, il introduit un bâtonnet d'iodoforme. Malgré l'extraction du corps étranger et malgré l'iodoforme, la panophtalmie suit son cours et, le 27 septembre à midi, on procède à l'exentération de l'œil droit. Le fragment de fer avait pénétré directement dans la chambre postérieure de l'œil; pendant l'opération, la plaie sclérotique est béante, de sorte qu'une partie du corps vitré s'écoule. Je le recueille immédiatement dans deux pipettes stériles et j'en fais des préparations directes, des cultures et une injection dans l'œil du lapin. L'œil a été exentéré environ 44 heures après la lésion.

Examen bactériologique du corps vitré. Examen direct. Dans les préparations (frottis) du corps vitré, on constate, en dehors des globules blancs, d'assez gros bâtonnets isolés ou par couples, à extrémités arrondies. Ces bacilles, semblables à ceux que nous avons décrits dans le premier cas, sont en plus petit nombre, on ne découvre pas de gros amas. Dans les diverses cultures, aérobies et anaérobies, il ne se développe qu'une espèce de bacille. Les cultures, pures d'emblée, sont très semblables à celles du premier cas. Afin d'éviter que, dans le cas d'infection mixte, une espèce bactérienne ne prenne le dessus, j'ai fait directement avec le corps vitré des plaques sur gélatine et j'ai repiqué plusieurs colonies isolées; je n'ai pas pu constater de différences entre ces diverses cultures.

Aspect microscopique du bacille. Bacilles assez gros, des dimensions du *Bac. subtilis* ou du *Bac. anthracis*, à extrémités arrondies, isolés, par couples et très souvent en chaînettes assez longues (pas aussi longues, cependant, que celles du *Bac. anthracis*). Les

bacilles, nettement mobiles dans les cultures jeunes, se colorent facilement et ne se décolorent pas par la méthode de Gram; ils forment des spores dans toutes les cultures, aussi sur gélatine à 22° C.

Cultures. Les premières cultures directes se sont mieux développées à la température de l'étuve à gélatine (22° C.) qu'à 37° C.; un tube de gélose, qui était resté stérile à 37°, donna une culture positive à 22°. Le nombre des colonies était plus grand dans les cultures sur gélatine que dans celles qui avaient été placées à 37° C. Dans les cultures ultérieures, à partir de la 3e génération, le développement a été aussi abondant à 35-37° C.

Gélatine. Sur plaques de gélatine, les colonies superficielles rondes apparaissent déjà après 24 heures; le 2e jour, la liquéfaction est déjà très avancée, et on ne voit plus de structure nette au microscope. L'examen microscopique des colonies jeunes dans la profondeur permet de distinguer une partie centrale plus dense et une partie périphérique diffuse, formée de prolongements filiformes. — Dans les tubes de gélatine, la liquéfaction se produit rapidement tout le long de la piqûre; la gélatine liquéfiée est trouble, des flocons s'amassent au fond du tube, quelques-uns restent en suspension dans le liquide.

Gélose. Les colonies superficielles isolées sont proéminentes, grisâtres, rondes, assez nettement délimitées; la partie centrale est souvent moins dense que la périphérie. La culture en strie n'a pas la tendance à s'étendre sur toute la surface, contrairement à ce que nous avons vu dans le premier cas.

Bouillon. Il se forme généralement à la surface du liquide une membrane mince, humide, tombant très facilement au fond du tube. Le bouillon se trouble en quelques heures; le dépôt est glaireux, assez abondant. Le bouillon sucré paraît être un peu plus favorable que le bouillon ordinaire.

Pomme de terre. Couche blanc grisâtre, proéminente, assez sèche, sans replis.

Sérum gélatinisé. Culture assez abondante; le sérum se liquéfie petit à petit.

Lait. Le lait est coagulé et peptonisé; la peptonisation est plus rapide encore que pour le bacille isolé du 1er cas.

Injection du corps vitré et des cultures pures dans l'œil du lapin.

Les résultats des expériences sont nettement positifs.

27 septembre 1902. *Lapin* 37, *O. droit.* Injection latérale dans le corps vitré de 1/10 c. c. environ du corps vitré de la malade; l'inoculation a lieu 1/2 heure à peine après l'exentération de l'œil. Le lendemain, panophtalmie typique. L'animal est sacrifié 22 heures après l'injection; sur la rétine, dépôt de pus grisâtre, typique, avec bacilles intra et extracellulaires. Le cristallin est normal d'aspect. Le corps vitré fournit une culture pure.

L'œil gauche, inoculé de la même manière (le corps vitré était mélangé de sang), n'a pas présenté de panophtalmie.

30 septembre 1902. *Lapin* 38. Injection latérale dans le corps vitré d'une première culture sur gélatine. Le lendemain, panophtalmie. Le lapin est tué 2 jours 1/2 après l'injection; le corps vitré fournit une culture pure, le sang du cœur est stérile.

30 janvier 1903. *Lapin* 44. Injection dans le corps vitré d'une émulsion de culture sur gélose. Le lendemain, panophtalmie typique.

Nous voyons, d'après ces expériences, que nous avons réussi à obtenir une panophtalmie typique chez le lapin en injectant, dans la chambre postérieure de l'œil, du corps vitré de la malade, une première culture et une culture ultérieure obtenue après un assez grand nombre de passages. Comme dans le premier cas, la panophtalmie est manifeste 18 à 24 heures après l'inoculation. Je n'ai observé aucune différence dans la marche de la maladie expérimentale occasionnée par l'un ou l'autre des deux bacilles.

Le résultat de l'examen bactériologique a été le même dans les 2 cas. J'ai réussi à déceler *dans le corps vitré de deux malades atteints de panophtalmie traumatique* (lésion par pénétration d'un fragment de fer de la pioche dans le corps vitré) *un bacille à l'état de pureté.* D'après la description que j'ai donnée plus haut, nous pouvons classer les deux bacilles dans le *groupe du Bacillus subtilis.* J'ai comparé les cultures des deux espèces entre elles et avec les diverses cultures de notre collection de l'Institut d'hygiène : elles se distinguent de notre *subtilis* par la liquéfaction plus rapide de la gélatine, par l'aspect différent de plusieurs cultures, sur gélose et en bouillon entre autres; elles se rappro-

cheraient plutôt de notre culture de *Bac. megatherium*, qui, d'autre part, présente aussi quelques propriétés distinctives. Je ne m'arrêterai pas plus longuement à cette question : tous les auteurs qui ont étudié le *B. subtilis* et ses proches parents savent qu'il n'y a guère deux cultures d'origine différente entièrement identiques. C'est pour la même raison que je n'essayerai pas de trancher la question de l'identité des bacilles trouvés dans les deux cas; à côté de nombreux points de ressemblance, nous pourrions citer quelques différences restées constantes à travers plusieurs générations : le premier bacille forme sur gélose des colonies déchiquetées qui ont la tendance à s'étendre sur toute la surface de la gélose, tandis que les colonies du deuxième sont rondes, nettement délimitées. Cette différence et quelques autres suffisent-elles pour différencier les deux microbes? Je ne le crois pas.

Avant de discuter le rôle spécifique de nos cultures, relatons les observations bactériologiques faites jusqu'ici dans des cas de panophtalmie traumatique. Un des premiers travaux qui aient paru sur la question est celui de Mme *Poplawska*[1]. Cet auteur a examiné histologiquement, à la clinique ophtalmologique de M. le professeur *Haab* à Zurich, une série de bulbes panophtalmiques, et a trouvé dans le corps vitré de six d'entre eux, provenant de lésions identiques à celle qui nous occupe, des bacilles assez gros, souvent en chaînettes. A en juger par les figures accompagnant le travail et d'après les reproductions photographiques que M. *Haab* a bien voulu me soumettre, il s'agit de formes microbiennes très semblables à celles qui nous occupent. Il n'est pas possible de conclure à une analogie complète, vu que, dans ces cas, il ne s'agit que de coupes histologiques et non d'examens bactériologiques complets. Peu après, *Haab*[2] communiquait le résultat de l'examen bactériologique d'un nouveau cas de panophtalmie, dont le corps vitré a été examiné 4 jours après l'infection. Il réussit à déceler un bacille assez grand, isolé et en chaînettes, poussant bien à l'étuve, mal sur la gélatine. Bien que l'auteur n'ait pas dénommé son microorganisme et qu'il n'ait pas recherché les spores, nous pouvons admettre, d'après la description qu'il nous donne des cultures, qu'il s'agit probablement aussi d'un bacille du groupe du *B. subtilis*. L'injection dans

1. *Arch. f. Augenheilkunde*. 1891, 22, p. 337.
2. *Fortschritte der Medicin*. 1891, n° 19.

l'œil du lapin occasionne une iritis avec exsudat pupillaire et avec infiltration du corps vitré. Haab conclut à l'identité de ce bacille avec ceux décrits par M. *Poplawska*. *Sattler*[1] a trouvé, dans un œil exentéré 14 jours après la lésion, un bacille pyocyanique. *Perles*[2] décrit, dans un cas examiné le 3e jour, des bacilles de la grosseur du *Bac. typhosus;* quelques-uns avaient une spore centrale; des cultures n'ont pas été faites. Dans un certain nombre d'autres cas, on a trouvé des diplocoques, des bacilles pseudo-diphtériques. Dans un cas de panophtalmie post-opératoire, *Bœmer*[3] a trouvé des bacilles ressemblant à certains *B. subtilis* (pas de culture).

Dans un travail paru tout récemment, *Kayser*[4] a confirmé les résultats que nous avions communiqués à Heidelberg; il a trouvé le *Bac. subtilis* dans le corps vitré, dans deux cas de panophtalmie traumatique (par fragment de pioche ou de pierre); dans le premier cas, opéré 2 jours après l'infection, la culture était pure d'emblée; dans le 2e, examiné le 8e jour, le *subtilis* était associé aux *staphylococcus pyog. aureus et albus*. L'inoculation de culture pure dans le corps vitré du lapin fournit un résultat nettement positif.

A côté de ces examens bactériologiques et cliniques, un assez grand nombre de *recherches expérimentales* ont été faites dans le but d'éclaircir l'étiologie de la panophtalmie. Les observations cliniques avaient déjà prouvé à l'évidence que, pour l'affection qui nous occupe, le danger ne réside pas dans la pénétration du fragment de fer dans l'œil : les forgerons et d'autres ouvriers travaillant le fer sont également sujets à des lésions du corps vitré, mais ne présentent qu'exceptionnellement cette forme grave et suraiguë de la panophtalmie. *Horner*, le regretté professeur de la clinique optalmologique de Zurich, avait déjà attiré l'attention sur la gravité des lésions produites spécialement par les fragments de pioche pendant le travail aux champs et surtout dans la vigne. Cette observation a été confirmée très souvent depuis. Il était tout naturel de chercher à reproduire la panophtalmie avec les microbes du sol. *Sattler*[5]

1. *Heidelberger ophtalmolog. Gesellschaft.*, 1891.
2. *Centralbl. fur prakt. Augenheilk*, 1892.
3. *Bericht der Heidelb. ophtalm. Gesellsch*, 1901.
4. *Centralbl. f. Bakt*, I., 33, p. 241, 1903.
5. Congrès internat. d'ophtalmologie, 1888.

a isolé divers microbes sporulés et a examiné leur virulence par injection dans l'œil du lapin; il n'a pas réussi à produire de panophtalmie avec ces bacilles. Il a vu, plus tard, que des microbes saphophytes, tels que le *Bac. prodigiosus*, pouvaient occasionner un abcès du corps vitré lorsqu'on les injecte directement dans l'œil. *Haab* (l. c.) n'a obtenu qu'une inflammation légère en injectant le *Bac. mycoïdes*. *Perles*[1] a fait une série de belles recherches sur la panophtalmie expérimentale; l'inoculation du *Bac. subtilis* dans le corps vitré lui a fourni des résultats négatifs, parfois de l'iritis : le *B. Friedländer* et le *Bac. typhique* seraient, d'après lui, les plus grands ennemis de l'œil du lapin. Perles insiste sur la gravité des lésions du corps vitré en comparaison de celles de la chambre antérieure de l'œil. *Lobanow* (cité par Kayser) n'a pas non plus réussi à obtenir la panophthalmie en injectant des cultures pures de *B. subtilis* dans l'œil du lapin.

Comme on le voit, d'après ce qui précède, le résultat des recherches expérimentales des divers auteurs ne nous permet pas de conclure au rôle pathogène du *B. subtilis* pour l'œil. Nous avons repris ces expériences; au lieu de cultures pures, nous avons inoculé de la terre. Le premier malade avait remis la pioche coupable à M. Baenziger; nous avons raclé un peu de la terre desséchée qui s'y trouvait et injecté, le 21 juillet 1900, une émulsion de cette terre dans l'œil d'un lapin : le résultat fut négatif, pas de panophtalmie. Pensant que la terre avait été par trop desséchée, M. le Dr Baenziger fit venir, l'été suivant, un échantillon de terre fraîche, recueillie dans le champ même où l'accident avait eu lieu. Cette fois-ci, le résultat a été nettement positif.

19 juillet 1901. *Lapin* 24. *O. dr.* Injection intra-oculaire dans le corps vitré, en traversant la cornée et le cristallin, d'une émulsion de terre dans de l'eau salée (7 0/00).

O. g. Injection latérale directement dans le corps vitré de la même émulsion.

Le 20 juillet au matin, l'œil droit présente une panophtalmie typique; l'œil gauche, par contre, n'est que légèrement enflammé.

Le lapin est sacrifié 25 heures après l'inoculation. Le corps

1. *Virchow's Archiv.*, 140, p. 209.

vitré de l'œil droit est trouble et renferme un pus grisâtre, il est tout à fait pareil à celui obtenu par injection de culture pure. L'œil gauche, qui paraissait moins atteint, présente des lésions analogues. A l'examen microscopique du corps vitré, on est frappé du grand nombre de gros bacilles ressemblant à ceux que nous avons décrits plus haut. Les cultures sur gélose et sur gélatine m'ont permis d'isoler un bacille sporulé ; il y avait encore d'autres microbes, entre autres du *B. coli*. Les cultures du corps vitré de l'œil gauche renfermaient plus de *B. coli ;* les colonies de gros bacilles étaient en moins grand nombre qu'à l'œil droit.

20 juillet 1901. *Lapin* 27 *O. dr.* Inoculation de 3/10 c. c. d'émulsion de terre dans la chambre antérieure de l'œil. Le lendemain, on aperçoit, à travers la cornée, les restes de la substance injectée, mais pas d'inflammation proprement dite; pas d'iritis. Le surlendemain, l'œil paraît tout à fait normal.

O. g. Injection de la même émulsion dans le corps vitré en traversant la cornée et le cristallin. Le lendemain, panophtalmie typique; le 3e jour, on voit deux ulcérations à la cornée. Le lapin est sacrifié le 23 juillet. L'examen de l'œil droit est négatif, l'œil est normal; les cultures de l'humeur aqueuse restent stériles. L'œil gauche présente les lésions typiques : abcès du corps vitré, infiltration de la rétine, épaississement de la choroïde, le cristallin est en partie purulent. A l'examen microscopique du corps vitré, les gros bacilles prédominent, il y a aussi quelques formes plus fines; dans les cultures, un bacille sporulé et du coli. J'ai isolé les deux microbes.

Ces expériences nous prouvent qu'*il est possible de provoquer une panophtalmie typique chez le lapin par l'inoculation d'une émulsion de terre dans le corps vitré.* Les bacilles à spores que j'ai isolés de l'œil des lapins 24 et 27 appartiennent également au groupe du *Bac. subtilis ;* ils présentent des différences entre eux et se distinguent aussi par certains caractères des deux bacilles isolés du corps vitré de l'homme ; il n'est pas nécessaire de s'arrêter à ces questions de détail.

Par inoculation des cultures pures des bacilles 24 et 27 dans le corps vitré du lapin, on reproduit une panophtalmie.

Comment expliquer, après ces résultats nettement positifs, les nombreux échecs des auteurs cités plus haut? Les expé-

riences que j'ai entreprises avec divers représentants du *Bac. subtilis* me permettent de répondre à cette question. Quelques cultures nous ont permis de reproduire une panophtalmie typique, d'autres pas. Les cultures de *B. subtilis* et de *Bac. mesent. vulg.* de notre collection de l'Institut d'hygiène, cultivées depuis longtemps en milieu artificiel, nous ont fourni un résultat négatif. Un autre bacille du même groupe, retiré à l'état de pureté du péritoine d'un lapin inoculé avec le contenu stomacal d'un malade de M. le Dr *Conrad Brunner* à Münsterlingen, a produit une panophtalmie typique. Il en a été de même de deux bacilles retirés du lait; l'un provenait d'une boîte de lait condensé (c'était un *B. mesentericus* assez typique), l'autre a été retiré d'un flacon de lait soi-disant stérilisé.

Que conclure de ces expériences?

Les deux bacilles isolés de bulbes panophtalmiques de l'homme peuvent être considérés comme les agents pathogènes de la panophtalmie; ces microbes se trouvaient l'un et l'autre à l'état de pureté dans le corps vitré et les cultures, injectées dans l'œil du lapin ou du chien, produisent une affection en tout semblable à la panophtalmie observée chez l'homme.

Il n'est pas possible d'identifier les bacilles décrits par les auteurs précités. La plupart n'ont été observés que dans les coupes histologiques. Le bacille obtenu par *Haab* me paraît se rapprocher plutôt du *Bacillus mesentericus; Kayser* appelle les deux bacilles *Bac. subtilis* sans en donner une description détaillée. Nous avons fait remarquer que les bacilles isolés dans nos deux cas présentent quelques différences entre eux et se différencient aussi de notre culture type de *B. subtilis.* Les recherches expérimentales nous ont permis de produire une panophtalmie typique avec des microbes différents; un des bacilles isolés du corps vitré de l'œil du lapin (27), qui avait reçu une émulsion de terre, se distingue assez nettement des deux bacilles « humains ».

Toutes ces observations me portent à admettre que *divers représentants du groupe du Bac. subtilis sont à même d'occasionner une panophtalmie chez l'homme, à condition toutefois d'être introduits dans le corps vitré; ces bacilles proviennent du sol.*

Il reste encore un grand nombre de questions à élucider sur l'étiologie de la panophtalmie qui nous occupe. L'une des plus

importantes me paraît être la *distribution géographique* de cette affection, M. *Baenziger* a proposé avec raison d'établir une statistique internationale. La Suisse orientale et la clinique de Zurich paraissent spécialement favorisées, tandis que, dans d'autres parties de la Suisse, à Lausanne par exemple, on ne connaît pas cette maladie. Les deux cas publiés par *Kayser* de Fribourg-en-Brisgau prouvent cependant qu'on observe cette forme de panophtalmie ailleurs qu'à Zurich.

Inutile d'ajouter que le *Bac. subtilis* ne doit pas être considéré comme la cause unique de la panophtalmie; les observations ultérieures nous permettront sans doute de dire dans combien de cas il est largement pathogène.

II

Après avoir établi le rôle pathogène du *Bacillus subtilis* dans la panophthalmie, nous voulons nous occuper de la *réaction du corps vitré après l'infection expérimentale*. Dans le courant d'une infection générale, un grand nombre de microbes pathogènes peuvent se localiser dans l'œil. M. le Dr *Sidler*, à Zurich, m'a fait voir dernièrement de très jolies coupes d'un bulbe oculaire avec des streptocoques dans le corps vitré; la malade avait été atteinte de panophtalmie durant une fièvre puerpérale à laquelle elle a succombé. On peut inversement occasionner une infection générale en injectant des microbes virulents dans le corps vitré. *Perles* (l. c.) n'a pas réussi à obtenir de panophtalmie en introduisant le *Bacillus anthracis* ou le *pneumocoque* dans le corps vitré du lapin; les animaux mouraient très rapidement d'infection généralisée. J'ai pu faire la même observation avec une culture de streptocoque. Cette culture, étudiée par M. le Dr *Simon*, tuait le lapin en 4 jours par injection sous-cutanée; injectée dans le corps vitré, elle produisit la mort en 24 heures. Dans une deuxième expérience, nous avons inoculé dans le corps vitré le même streptocoque mélangé au bacille obtenu de notre premier cas : pas de panophtalmie, mais le lapin meurt en 24 heures; dans le sang, culture pure de streptocoque.

Le *Bacillus subilis se comporte tout différemment; lorsqu'on l'introduit dans le corps vitré, il reste localisé à l'œil*. Dans aucun cas, je n'ai réussi à trouver le *subtilis* dans le sang ou dans les organes des lapins inoculés dans l'œil. Ceci nous porte à

admettre que, *pour qu'ils puissent produire la panophtalmie, les microbes ne doivent pas être trop virulents pour l'individu atteint.* Nous savons que, pour ne citer que l'exemple du streptocoque, une culture peu virulente injectée sous la peau ne produit qu'un abcès localisé, tandis qu'une culture dont la virulence est exaltée, injectée dans les mêmes conditions, tue l'animal par septicémie sans occasionner de réaction au point d'inoculation; il en est de même pour un grand nombre d'autres microbes. L'abcès du corps vitré est donc comparable, jusqu'à un certain point, avec un abcès sous-cutané.

La *forme de panophtalmie qui nous occupe est une affection très grave pour l'œil,* parce qu'elle occasionne la perte de la vue, mais elle n'est *pas dangereuse pour l'organisme,* à moins d'infection secondaire, parce que l'agent étiologique, le *Bacillus subtilis,* n'est n'est pas pathogène pour *les autres organes.* Ceci nous explique pourquoi l'exentération de l'œil peut être exécutée à la période d'état de la maladie sans aucun danger.

Comment se comporte le *Bacillus subtilis* dans le corps vitré? La panophtalmie à *subtilis* est une affection bactérienne de courte durée. Les symptômes d'inflammation, très prononcés au début, disparaissent au bout de quelques jours, l'œil se ratatine, et la chambre postérieure de l'œil ne renferme plus qu'un pus tout à fait stérile. Le *Bacillus subtilis disparaît rapidement de l'œil;* 18 à 24 heures après l'infection, on trouve généralement un assez grand nombre de bacilles dans le corps vitré, le 2ᵉ jour, les bacilles sont déjà peu nombreux et, en sacrifiant l'animal trois jours après l'inoculation, les cultures du corps vitré restent souvent stériles.

L'examen microscopique de frottis du corps vitré nous permet de nous rendre compte du *mécanisme de la destruction des microbes.* On peut observer, dans le corps vitré retiré 18 à 24 heures après l'infection, une *phagocytose très nette;* à côté de bacilles libres, on voit des phagocytes renfermant 2, 6, et jusqu'à 10 et 12 gros bacilles. Les bacilles phagocytés ne se colorent pas tous de la même manière; quelques-uns paraissent déjà nettement dégénérés, tandis que d'autres présentent une coloration uniforme et intense. La marche clinique coïncide avec les résultats de l'examen bactériologique et microscopique; la panophtalmie expérimentale est à son apogée 24 heures

après l'infection, alors que les bacilles sont encore nombreux et que les phagocytes sont en pleine activité.

La marche de l'affection chez l'homme paraît être assez semblable à celle de la panophtalmie expérimentale. Des deux cas que nous avons examinés, le premier a été opéré 29 heures après l'infection; le corps vitré renfermait un très grand nombre de bacilles; dans le deuxième cas, examiné après 44 heures environ, les bacilles étaient beaucoup plus rares. *Kayser* (l. c.) a trouvé le *Bacillus subtilis* dans le corps vitré le 2e jour dans son premier cas; chez son deuxième malade, il a trouvé le même bacille dans la conjonctive de l'œil malade à côté de staphylocoques, tandis que le corps vitré, examiné le 19e jour, était stérile. Le Dr *Sidler* a examiné très attentivement à la clinique ophtalmologique de Zurich trois bulbes panophtalmiques exentérés plusieurs jours après le début de l'affection, sans réussir à y déceler un seul microbe. *Haab* avait obtenu dans un cas une culture positive, le 4e jour. Il est probable que les diplocoques, les bacilles pseudodiphtériques et autres, trouvés dans des cas de panophtalmie, n'étaient pas les agents pathogènes, mais bien plutôt des saprophytes de la conjonctive, tandis que le microbe cause de la maladie avait disparu. Nous comprenons aussi pourquoi les bacilles décrits plus haut n'ont pas été observés plus souvent.

Cette observation me paraît être d'un intérêt général. La *panophtalmie due au Bacillus subtilis est une maladie bactérienne localisée à marche très rapide; l'agent pathogène ne peut être décelé avec quelque chance de succès que si l'examen bactériologique a lieu dans les premiers jours après le début de l'affection.*

Le *Bacillus subtilis* a été considéré jusqu'ici comme non pathogène pour l'homme; il ne peut que difficilement s'accoutumer à vivre dans le corps des animaux à sang chaud. Les phagocytes ont vite raison de ce microbe et, pourtant, la panophtalmie est une affection très grave de l'œil. Cette gravité est due d'une part à la sensibilité de l'organe atteint, surtout de la rétine, et sans doute aussi à la structure du corps vitré; au point de vue bactériologique, l'affection n'est pas grave en elle-même, puisqu'elle reste localisée et puisque l'agent pathogène est rapidement détruit.

Un point qui mérite d'être relevé, c'est le fait que, dans nos

deux cas, de même que dans les 2 observations rapportées par *Kayser, le corps vitré s'est montré particulièrement favorable au développement du Bac. subtilis.* On devrait s'attendre, de prime abord, à rencontrer une flore bactérienne très riche, vu que la terre renferme une grande quantité de microbes; il n'en est rien : dans les 3 cas de panophtalmie où le corps vitré a été examiné directement, le *subtilis* s'y trouvait en culture pure. Le 4e cas (de *Kayser*) représente une infection mixte avec des staphylocoques, mais il me paraît fort probable que ces staphylocoques provenaient de la conjonctive. Il est donc permis de supposer que, des divers microbes qui pénètrent dans l'œil avec la parcelle de terre ou de pierre, le *Bac. subtilis* est le seul qui se multiplie. Je ne voudrais pas prétendre que le *Bac. subtilis* est la seule cause de la forme de panophtalmie qui nous occupe, mais, en tenant compte aussi des observations de *Haab* et de *Poplawska,* nous pouvons admettre qu'il est très fréquemment en cause. Dans les cas de panophtalmie expérimentale obtenus chez le lapin par injection d'une émulsion de terre, les bacilles du groupe du *subtilis* étaient en très grand nombre, mais non à l'état de pureté; il y avait en outre du *B. coli;* il est vrai que la quantité de terre était beaucoup plus grande que celle qui pénètre dans le corps vitré lors de la lésion spontanée.

J'ai recherché le *pouvoir pathogène* des bacilles de la panophtalmie *pour les animaux de laboratoire,* et j'ai essayé d'obtenir des produits toxiques. *Une culture fraîche sur gélose ou en bouillon, injectée dans le péritoine d'un cobaye tue, très rapidement, en* 4, 6 *ou* 8 *heures;* je ne connais pas de microbe pathogène qui agisse plus vite. Il faut, il est vrai, *injecter une assez grande quantité* de culture, un tube de gélose ou 6 à 8 c. c. de bouillon, pour obtenir ce résultat à coup sûr; les deux bacilles isolés de l'œil humain et le bacille de Munsterlingen, retiré du contenu de l'estomac, se comportent de la même façon. En n'injectant que quelques anses de platine de culture sur gélose ou 1 à 2 c. c. de culture en bouillon dans le péritoine, le cobaye ne présente pas de symptômes morbides. En injection sous-cutanée, une dose, mortelle lorsqu'on l'introduit dans le péritoine, est tolérée; il se forme un très fort œdème, qui se termine par un abcès, mais le cobaye ne meurt pas. En règle générale, l'animal inoculé, qui a survécu 12 heures à l'injection, résiste par la suite. A l'autop-

sie, on trouve dans le péritoine une assez grande quantité de liquide séreux, légèrement trouble; cet exsudat est toujours rouge lorsque la culture injectée est vivante. La séreuse est hypérémiée dans tout l'abdomen, mais les glandes surrénales ne sont pas rougies comme après injection du bacille de la diphtérie. Les autres organes ne présentent pas de lésions macroscopiques. Le liquide péritonéal renferme toujoursbe aucoup de bacilles bien colorés, mais peu de leucocytes. Les cultures du sang du cœur sont toujours positives, bien que les bacilles y soient rares; dans la rate, on ne trouve que peu de microbes; il s'agit donc d'une affection localisée au point d'injection, sans que cette localisation soit absolue. Dans un cas où un cobaye injecté sous la peau avait été sacrifié après 24 heures, j'ai pu constater une phagocytose très prononcée dans le tissu sous-cutané.

Le Bacillus subt. de la panophtalmie est moins pathogène pour le lapin et pour la souris. Des lapins ont supporté 6, 8 et même 10 c. c de culture en bouillon en injection intraveineuse; un lapin qui avait reçu 8 c. c. de diverses cultures est mort en 6 heures, un autre, que j'avais inoculé plusieurs fois dans le but d'obtenir un sérum actif, est mort après injection intrapéritonéale d'une culture entière sur gélose. L'injection de 1 à 2 c. c. de culture en bouillon ou en gélatine ne tue pas toujours la souris.

Comment expliquer la mort si rapide à la suite d'injection de culture dans le péritoine du cobaye? *Flugge*[1], qui a fait la même observation en injectant des bacilles peptonisants du lait, bacilles proches parents de ceux qui nous occupent, admet qu'il s'agit d'une action toxique. J'ai fait une série d'expériences pour élucider cette question. Les cultures stérilisées à l'autoclave à 115° sont inactives dans le corps vitré. Je n'ai pas réussi à tuer le cobaye en injectant jusqu'à 10 c. c. de bouillon filtré; une culture filtrée dans du lait n'a pas produit de panophtalmie chez le lapin, pas plus que le bouillon filtré. J'ai essayé de déterminer la toxicité des corps microbiens traités au formol. Des cultures sur gélose en flacon plat à grande surface âgées de 1 à

1. *Zeitschr. f. Hyg.* XVII.

2 jours, au moment où elles sont le plus virulentes, sont raclées et émulsionnées dans un peu d'eau salée à 8 0/00. L'émulsion est recueillie dans un tube ordinaire; on verse quelques gouttes de formaline sur le coton et on ferme au moyen d'un capuchon de caoutchouc. Après 2 ou 3 jours, l'émulsion est stérile; j'ai toujours neutralisé le formol par l'ammoniaque. Les émulsions traitées de la sorte pouvaient être injectées à fortes doses dans le péritoine des cobayes; j'ai injecté des quantités de bacilles correspondant à 4 ou 6 fois la dose mortelle de culture vivante sans que la mort s'ensuivît.

L'autolyse, préconisée par *Conradi*[1] pour la toxine du bacille typhique, ne m'a pas fourni de résultats plus probants. Une culture jeune sur gélose est diluée avec un peu d'eau salée à 9 0/00; l'émulsion est laissée pendant 2 jours à l'étuve pour favoriser la dissolution des microbes (la plupart restaient intacts), puis filtrée à la bougie. *Conradi* dessèche encore dans le vide; je me suis servi directement de liquide filtré; ce liquide, injecté dans le corps vitré du lapin ou dans le péritoine du cobaye, s'est montré inactif, tandis que le dépôt a tué le cobaye (l'exsudat n'était pas rouge, dans ce cas).

Je n'ai donc pas réussi, jusqu'ici, à déceler la substance active, ni dans les cultures filtrées, ni dans les cultures chauffées, ni dans les cultures traitées à l'aldéhyde formique, ni dans celles que j'avais soumises à l'autolyse. La substance active paraît être liée au corps du bacille et sensible à la chaleur et aux agents chimiques.

L'*exsudat péritonéal* des cobayes morts après une injection intrapéritonéale ne s'est *pas montré plus virulent que les cultures*. Des cobayes ont supporté jusqu'à 2, 5, c. c. de cet exsudat, frais ou filtré; inoculé dans le corps vitré du lapin, il produit la panophtalmie typique.

Nous avons vu que l'exsudat péritonéal obtenu par injection d'une culture vivante était toujours nettement rouge. En mettant des globules rouges du sang de lapin préalablement lavés à l'eau salée en contact avec une culture vivante, on observe une *hémolyse typique*, même lorsque le tube est conservé à la glacière. L'hémolyse n'a pas eu lieu avec une culture filtrée, ni avec une émulsion concentrée, stérilisée à l'autoclave (30 minutes à 115°.)

1. *Deutsche med. Vochenschr.* 1903. N° 2.

En me servant, pour une plaque de Pétri, de gélose mélangée avec du sang de lapin, j'ai observé, lorsque les colonies sont isolées, une auréole décolorée autour de chaque colonie, tandis que la colonie paraît légèrement rosée.

SUR UN NOUVEAU STREPTOTHRIX

(STREPTOTHRIX POLYCHROMOGÈNE)

PAR M. H. VALLÉE D'ALFORT

Ce nouveau chromogène, pour lequel je propose le nom de *Streptothrix polychromogène*, a été isolé en 1898 du sang d'un cheval mort de pasteurellose aiguë. Il s'agit donc d'un associé banal, dont l'étude biologique offre cependant quelque intérêt.

I. CULTURES. — Il est strictement aérobie ; il cultive sur les différents milieux en donnant toujours une culture caractéristique.

Bouillon peptonisé. — Dès la 15e heure, le liquide se couvre d'un voile fragile et incolore ; vers le 3e jour, ce voile prend une teinte rose saumon très pâle, qui va en s'accentuant peu à peu. Après 8 à 15 jours, le voile se brise et tombe au fond du tube sous forme d'un peloton visqueux ; une petite quantité du pigment se dissout alors dans le bouillon qui n'a jamais cessé d'être limpide.

Gélose peptonisée. — Développement en 48 heures ; la coloration rouge saumon, peu manifeste au début, devient évidente en quelques jours et gagne petit à petit en intensité. Après un mois, la couche microbienne présente une teinte vieux rose très riche ; sa surface est luisante et irrégulièrement plissée. Considérée isolément, la colonie présente un bouton central saillant avec une zone périphérique plus pâle et une auréole finement rayonnée.

Gélatine. — La culture est obtenue après 48 heures de séjour à l'étuve à 18° ; son aspect est identique à celui des cultures sur gélose ; on n'observe jamais de liquéfaction du milieu.

Pomme de terre normale. — Après 16 heures de présence à l'étuve la surface ensemencée prend une teinte gris rosé, terne, qui passe au rouge jaunâtre en vieillissant ; si l'on retire le tube de l'étuve, alors que la culture est bien développée, la teinte rouge, gagnant en intensité, devient parfois d'un rouge vif presque vermillon. La pellicule microbienne est plissée, granuleuse verruqueuse et sèche.

Lait. — La culture se fait comme en bouillon et sans coagulation.

Quel que soit le milieu utilisé, la culture est obtenue très facilement à des températures comprises entre 18° à 38° et, comme on l'a vu, le développement en est extrêmement rapide. La culture est possible encore à des températures de 42°, 44°, 45° et même 47°; à ces températures, le microbe fournit tout aussi bien son pigment qu'à 38°.

Culture in vivo. — La culture *in vivo* en sacs de collodion dans le péritoine du lapin est réalisable si l'on a le soin de peu remplir les sacs, afin qu'ils contiennent un assez grand volume d'air. En 48 heures, la culture .obtenue est discrète et floconneuse, à peine pigmentée; après un séjour prolongé des sacs dans la cavité péritonéale, la pigmentation n'est pas plus riche et la culture est encore pauvre.

Résistance du parasite. — La culture en bouillon résiste au chauffage à 60° pendant cinq minutes, mais elle est stérilisée par chauffage à 65° durant le même temps. Certaines formes paraissent plus résistantes, puisque nous avons pu chauffer un voile à 65° pendant 20 minutes sans altérer sa vitalité.

Les milieux de culture soumis, aussitôt après l'ensemensement, à une large insolation restent stériles. La lumière par contre n'altère que lentement les cultures luxuriantes et reste presque sans action sur leur couleur.

Le Strep. polychromogène conserve très longtemps sa vitalité dans les milieux de culture; des cultures abandonnées à la lumière diffuse, à la température du laboratoire, restent vivantes pendant plus de trois ans.

II. Morphologie. — La coloration du Streptothrix polychromogène est facile. Le parasite se colore très bien par la méthode de Gram-Nicolle et retient énergiquement la couleur; le bleu Borrel à 1 0/0 et la thionine phéniquée sont les couleurs qui donnent les résultats les meilleurs pour l'étude des filaments.

Après 12 à 18 heures, on trouve dans le bouillon de culture de longs filaments assez uniformément calibrés et admirablement ramifiés. Parfois on observe à leur extrémité un léger renflement assez mal coloré.

Dans les préparations faites après 48 heures de séjour à

l'étuve, on ne trouve plus, après coloration par le Gram-Nicolle, que de rares filaments allongés, noyés au milieu d'innombrables petits segments arrondis à leurs extrémités, tous égaux entre eux, qui fixent la couleur avec intensité et simulent les chaînettes d'un gros streptocoque. En réalité, cette segmentation, qui pourrait faire croire à l'existence de spores, n'est qu'apparente. Si, au lieu de colorer par le Gram, on utilise le bleu Borrel, on constate que le filament primitif n'a pas totalement disparu; il persiste sous forme d'une gaine qui se colore mal et renferme des masses qui se colorent avec autant d'intensité que le filament primitif.

Cette condensation particulière de la substance chromatique ne s'effectue que dans les cultures largement aérées. Elle est constante dans les cultures un peu vieilles sur milieux solides; dans celles-ci, c'est seulement au contact même du milieu nutritif que l'on retrouve encore de rares filaments uniformément colorables. Les voiles qui couvrent les bouillons, brisés et immergés dès la 24e heure de leur développement, fournissent indéfiniment des filaments uniformément colorables, tandis que ceux qui restent au contact de l'air donnent bien vite des condensations chromatiques.

A côté de ces pseudo-spores, on trouve dans les cultures largement aérées des filaments sporifères qui donnent des chaînettes de spores comparables à celles de certains autres représentants du genre *Oospora*.

Dans les cultures obtenues à des températures de 42-47°, on ne trouve que des formes filamenteuses; les spores et pseudospores font d'ordinaire totalement défaut.

La culture *in vivo* en sacs de collodion, fournit des formes ramifiées plus stables et plus belles que celles des cultures *in vitro*. Dans certains cas, après 11-15 jours de séjour du sac dans le péritoine du lapin, les filaments présentent à leur extrémité terminale des renflements simulant des massues courtes. Après coloration au Ziehl suivie de l'action du chlorhydrate d'aniline et de la décoloration par l'alcool absolu, le filament faiblement coloré présente un renflement terminal, ovoïde, à contenu clair avec une paroi plus fortement colorée. Le chauffage à 75° de ces cultures (durant cinq minutes) suffit à les stériliser.

Influence du milieu. — Par l'addition de 5 à 10 0/0 de glycérine aux milieux solides ou liquides, on obtient des cultures

absolument différentes du type décrit précédemment. La teinte rouge qui caractérise les cultures sur les milieux ordinaires, fait place à une coloration d'un beau jaune franc qui tend à devenir orangé par vieillissement.

Les cultures sur milieux glycérinés, entretenues par repiquages successifs durant plusieurs mois, reprennent, dès le premier réensemencement sur les milieux ordinaires, la couleur rouge normale.

La culture dans un milieu artificiel à base de saccharose et de phosphate de potassium, à des degrés divers d'alcalinité et d'acidité, est très discrète et incolore. Tandis que la culture en milieux glycérinés ne modifie en rien la morphologie du Streptothrix, la culture dans ce milieu artificiel provoque des déviations énormes du type normal. Dans le milieu neutre, on ne trouve que des segments courts, presque ellipsoïdes, et des formes un peu plus renflées ; en milieu acidulé, le streptothrix donne des agglomérats d'éléments fusiformes dont la partie centrale seule se colore bien; d'autres articles simulent des spermatozoïdes à flagelle très court; sur un même filament on peut rencontrer des renflements successifs ou bien un simple renflement terminal; les filaments sont finement striés transversalement et se colorent moins bien que les renflements. Tous ces détails sont bien mis en évidence par la coloration à la safranine anilinée.

Pigments. — Le pigment rouge des cultures en milieux peptonisés est très légèrement soluble dans l'eau pure ou acidulée, peu soluble dans l'alcool, très soluble dans l'éther et le chloroforme. Le chloroforme mis au contact de la culture prend une teinte saumonée assez intense; l'éther convient moins bien que le chloroforme pour l'extraction du pigment rouge; les solutions éthérées de ce dernier sont ambrées au lieu d'être rouges.

Le pigment jaune des cultures sur milieux glycérinés est très peu soluble dans l'eau et dans l'alcool, très soluble au contraire dans l'éther et le chloroforme, qui prennent une belle teinte jaune d'or variable en intensité selon l'âge de la culture. Par l'évaporation de ces solutions, on obtient une masse amorphe, granuleuse, colorée en jaune.

Les pigments résistent longtemps à la lumière diffuse et sont insensibles aux acides et aux alcalis.

III. Inoculations — L'inoculation intra-veineuse ou intra-péritonéale aux divers animaux de laboratoire et aux grands animaux (cheval bœuf), de doses massives de cultures *in vitro* du St. polychromogène ne produit jamais d'accidents immédiats bruyants.

Les inoculations intra-cérébrales pratiquées à doses élevées, même chez de jeunes animaux, l'association aux cultures de substances à chimiotaxie négative ne provoquent pas non plus l'apparition de phénomènes aigus.

Les cultures *in vivo*, en sacs de collodion dans le péritoine du lapin, qui modifient sensiblement la morphologie du Streptothrix, ne lui impriment même pas un caractère pathogène léger. Malgré des passages successifs en sacs durant plusieurs semaines, les cultures n'acquièrent pas la moindre virulence.

Toxicité des cultures. — Si les cultures du Strept. poly. sont toujours dépourvues de virulence, leur toxicité pour le cobaye et le lapin est évidente. Chez les animaux inoculés avec des cultures en bouillon peptone, issues de passages en sacs de collodion, on relève un amaigrissement progressif, rapide, mortel dans presque la moitié des cas. Le cobaye perd, dans ces conditions, le quart, le tiers, parfois la moitié de son poids; après trois semaines environ, ou bien les animaux augmentent progressivement de poids et se rétablissent complètement, ou bien ils succombent sans présenter de lésions apparentes.

En résumé le *Streptothrix polychromogenes*, bien différencié des autres types du genre par le seul aspect de ses cultures, offre, comme autres particularités : une végétabilité remarquable, la propriété d'engendrer des pigments de couleur variable suivant le milieu, des variations morphologiques intéressantes et des propriétés toxiques plus nettes que celles des autres *Oospora* non pathogènes.

INSTITUT ANTIRABIQUE DE NAPLES

dirigé par M. le professeur A. Cardarelli.

Sur l'existence du virus rabique dans le siège de la morsure
D'UN ENFANT MORT DE RAGE

PAR D. PACE

PRIVAT-DOCENT DE PATHOLOGIE INTERNE
PRÉPARATEUR A L'INSTITUT.

La pathologie expérimentale de la rage, si riche qu'elle soit en découvertes faites, manque entièrement de recherches sur le siège de la morsure, c'est-à-dire sur l'endroit où le chien a déposé le virus rabique.

Du moment que l'animal mordeur a lacéré la peau, jusqu'au jour où éclatent les symptômes, nous ne savons rien de la lésion périphérique, des modifications intimes de la plaie ni de l'existence ou de l'activité du virus dans ce lieu.

La blessure guérit, une belle cicatrice apparaît : celle-ci est parfois à peine manifeste, et souvent elle est entièrement oubliée de la personne qui la porte.

Cependant après une période de temps variable, la maladie s'annonce; et le plus souvent, ce qui donne l'alarme, c'est la cicatrice elle-même, qui, guérie et oubliée, se réveille avec une série de phénomènes soit phlogistiques, soit nerveux.

Ce sont ces phénomènes, que l'ancienne expérience a déjà consacrés par les paroles de COELIUS AURELIANUS : « *Præpatitur ea pars, quæ morsu fuerit vexata* », et encore par le « *tumor renitens* » de HOFFMANN, phénomènes qui se rencontrent aussi chez les animaux et qui tout récemment ont été aussi expérimentalement reproduits par M. DI MATTEI [1].

1. DI MATTEI, Sulla reazione delle ferite rabbiche sperimentali come segno premonitorio dell' infezione, *Rivista d'Igiene e Sanità pubblica*, a. XIII, 1902.

Que se passe-t-il dans l'intérieur de cette cicatrice, qui, dans la période prodromique de la rage, devient rouge, turgide et douloureuse? Quelles altérations histologiques peut-on constater dans la cicatrice et surtout dans les petits nerfs, qui peuvent s'y trouver?

Et le virus qu'elle a reçu, le conserve-t-elle encore tel qu'à l'époque de la première lésion; ou au contraire s'en est-elle dégagée, après lui avoir donné course le long des nerfs, pour rejoindre d'autres sièges, tels que les nerfs périphériques, la moëlle, le bulbe?

Voilà les demandes que je me suis proposé d'approfondir à l'occasion de deux individus qui étaient atteints de rage, et dans lesquels les cicatrices se présentaient avec tous les caractères que nous avons indiqués plus haut. Les personnes mordues étant mortes, j'ai pu me procurer les cicatrices et j'ai pu faire des recherches histologiques dans les deux cas, et des recherches expérimentales seulement dans le second. Ce n'est que de ces dernières que je veux parler à présent.

Ces recherches expérimentales ont pour but de prouver la présence ou l'absence du virus rabique dans le siège de la morsure par rapport à la peau saine, aux nerfs, au bulbe et aux glandes salivaires du même individu.

Avant tout je donnerai quelques détails sur l'individu dont la cicatrice fut l'objet de mes recherches.

Antoine D. Pr. âgé de six ans, né à Corbara (Salerno), paysan. Le 19 juillet 1902, pendant que l'enfant ramasse des noix, morsure par un chien dans le mollet de la jambe gauche nue, produisant 2 blessures, une petite en haut, qui ne saigne pas, l'autre en bas, de la longueur de 10 centimètres, profonde jusqu'aux muscles, saignant beaucoup. Le chien est tué et enterré. On lave les blessures de l'enfant fréquemment avec du sublimé.

Après 15 jours tout est cicatrisé; les parents m'assurent que sur le siège de la lésion on ne voyait qu'une bande luisante et plane, sans aucune croûte, sans aucun reste de sang grumelé. Le 19 août, c'est-à-dire 31 jours après la morsure, l'enfant accuse de la céphalalgie, une indisposition générale; le lendemain hydrophobie, aërophobie, dysphagie. Le 21 on conduit l'enfant à notre Institut antirabique; nous constatons tout le tableau de la rage développée et nous faisons recevoir l'enfant dans l'Hôpital des *Incurabili*, où il meurt la nuit même.

L'autopsie est faite 48 heures après la mort.

Je décris tout de suite les lésions que j'ai observées:

Sur le mollet de la jambe gauche on observe 2 cicatrices. L'une supé-

rieure, cicatrisée, enfoncée, qui montre presque la grandeur et la forme de la dent perforatrice : elle est d'une couleur normale. La cicatrice inférieure a une direction transversale : elle est longue de 10 centimètres, large de 7-8 millimètres, sur 4/5 de sa longueur elle est complètement cicatrisée, le reste ne l'est pas encore, et cette partie est sèche, couverte d'une petite croûte, que l'on peut bien facilement ôter. La cicatrice tout entière est rouge, livide, infiltrée, adhérente aux tissus. Ayant isolé avec soin tout le petit nœud cicatricial des adhérences par l'aponévrose du soléum et l'ayant délivré de la graisse, je détache de son centre un petit segment, qui, haché finement et émulsionné, sert à inoculer des lapins.

Dans le même temps et de la même manière je prépare de petits morceaux de bulbe et de sciatique, aussi bien du côté de la lésion que du côté non atteint, et aussi des morceaux de peau saine et de glandes salivaires.

J'inocule 14 lapins : 5 avec la seule cicatrice, 3 dans la chambre antérieure de l'œil et 2 en plaçant le matériel directement sur le sciatique dénudé. Les 11 autres lapins sont inoculés avec le reste du matériel dans la chambre antérieure de l'œil et dans le muscle cucullaire.

Je passe les résultats négatifs des inoculations, à cause de la mort accidentelle survenue aux lapins; je note seulement les résultats positifs des recherches.

Nº d'ordre	Matériel d'inoculation	Manière d'inoculation	Date de l'inoculation	Période d'incubation	Mort
I	Bulbe	œil	24 VIII 1902	16 jours	10 IX 1902
II	N. sciatique gauche	—	— — —	12 —	6 — —
III	N. sciatique droit	—	26 — —	18 —	14 — —
IV	Glande sous-max.	m. cucullaire	— — —	18 —	14 — —
V	Peau saine	œil	24 — —	— —	7 — —
VI	Cicatrice a	œil	— — —	14 —	8 — —
	Cicatrice b	sciatique	— — —	20 —	15 — —
	Cicatrice c	sciatique	— — —	23 —	20 — —

Les lapins, qui avaient été inoculés avec le bulbe, les deux sciatiques, la glande sous-maxillaire et la cicatrice, tombèrent malades avec les signes d'affection rabique de 12 à 23 jours après l'inoculation et moururent avec les phénomènes classiques de la paralysie après 1 à 4 jours de maladie.

Le lapin inoculé avec la peau saine fut trouvé mort le 13e jour après l'inoculation, mais il n'avait présenté dans les jours précédents aucun signe d'infection rabique.

Cependant, pour bien m'assurer de la virulence de la cicatrice en rapport avec la peau saine et le sciatique droit, c'est-à-dire celui du membre qui n'avait pas été mordu — car il n'y a pas à disputer sur la virulence du bulbe, des glandes salivaires et du sciatique du membre lésé, — je fis les contrôles suivants sur des lapins, qui étaient morts après l'inoculation du sciatique droit (n° II du tableau précédent), de la cicatrice (n° VI *a* et *b* *ibid.*) et de la peau saine (n° V *ibid.*).

Matériel de contrôle		Date de l'inoculation	Période d'incubation	Mort	Observations
N. sciatique droit	1.	14 IX 1902	20 jours	5 X 1902	
	2.	— — —	39 —	25 — —	
Cicatrice (œil)	1.	8 IX —	12 —	21 — —	
	2.	— — —	24 —	4 X —	
	3.	14 X —	12 —	26 — —	
	4.	— — —	13 —	31 — —	
Cicatrice (sciatique)	1.	14 X —	19 —	4 XI —	
	2.	— — —	—	—	Survit le 15 X 1902.
Peau saine	1.	8 IX —	—	14 IX —	
	2.	— — —	—	15 — —	
	3.	14 X —	—	25 X —	
	4.	— — —	—	1 XII —	

Les contrôles du sciatique droit, tombés malades le 20e et le 39e jour, moururent de rage après 1 à 2 jours.

Parmi les contrôles de la cicatrice, 5 tombèrent malades de rage après 1-4 jours de maladie, le 6e contrôle vivait encore 2 mois après l'inoculation, quand on mit fin à l'observation.

Les 4 contrôles de la peau saine moururent tous accidentellement sans montrer jamais aucun signe de paralysie ni de véritable dénutrition, les 6e, 7e, 11e et 48e jours.

Ces données prouvent clairement la virulence non seulement du bulbe et de la glande salivaire, mais aussi des deux sciatiques, soit de celui du côté de la morsure, soit de celui du membre non mordu.

Et cela s'accorde bien avec les recherches de Pasteur, Bardach et Roux, déjà enregistrées dans la littérature (Zagari[1], Marie[2]). Mais cette dernière observe le plus complet silence sur la virulence de la peau de l'homme hydrophobe.

1. Zagari, *La Rabbia* (nel Trattato italiano di Patologia e Terapia medica). Èdit. Vallardi, Milano.
2. Marie A., *La Rage*, Masson et Cie, Paris.

Les données que j'ai recueillies laissent sûrement exclure la présence de virus rabique dans la peau de l'hydrophobe, car des contrôles moururent, 2 de 6 à 7 jours, et 2 de 11 à 48 jours après l'inoculation, sans avoir présenté, comme nous avons déjà dit, des faits paralytiques ou au moins une profonde dénutrition, comme nous voyons qu'en produisent souvent les virus de rues beaucoup atténués. Mais le résultat le plus important qui n'admet aucun doute, et sur lequel je désire appeler l'attentin du lecteur, c'est celui qui dérive des contrôles de la cicatrice.

Ce résultat justifie la conclusion que *la cicatrice cutanée sur le lieu de la lésion de l'homme hydrophobe contient certainement du virus rabique.*

L'importance de ce fait est évidente. S'il était confirmé, comme j'espère bien qu'il le sera, par d'autres cas, surtout par ceux à période d'incubation très longue, il constituerait la première donnée positive expérimentale, nécessaire pour comprendre les phénomènes réactifs du siège de la lésion dans la rage développée, démontrant un rapport direct entre ces phénomènes et l'existence du virus rabique dans la morsure.

LA RAGE DANS L'AFRIQUE DU SUD

PAR LE Dr ADRIEN LOIR

Le 6 septembre 1902, l'Institut Pasteur recevait une dépêche venant de Londres, de la Chartered, compagnie de l'Afrique du Sud, demandant le départ immédiat d'un expert pour la Rhodésie. Il s'agissait de traiter les cas de rage et de prendre les mesures nécessaires pour arrêter l'épidémie qui venait d'apparaître entre le Zambèze et le Transvaal.

Mes maîtres voulurent bien me proposer de me charger de cette mission.

Dès mon arrivée à Bulawayo, j'ai inoculé les lapins de passage avec des cerveaux conservés dans la glycérine, selon la méthode du docteur Roux, et, le 22 octobre, j'ai commencé les inoculations pasteuriennes sur les personnes mordues par des chiens enragés. Mon séjour en Rhodésie a duré exactement trois mois pendant lesquels j'ai eu à traiter onze personnes. Toutes étaient en bon état de santé le 10 janvier, jour où j'ai remis la direction de l'Institut Pasteur de la Rhodésie à mon sucesseur, le docteur Doydson, que je venais de mettre au courant du traitement antirabique.

J'ai appliqué la méthode ordinaire de Pasteur, avec la modification si commode du docteur Calmette, c'est-à-dire en n'inoculant que trois ou quatre lapins par mois, et en conservant les moelles atténuées dans la glycérine. J'avais usé de ce moyen à Tunis pendant plusieurs années.

Au moment où je suis arrivé en Rhodésie, on mettait encore en doute l'existence de la rage dans le pays. Après avoir vu plusieurs cas d'hydrophobie chez le chien, j'ai pu, dès le 7 novembre, affirmer l'existence de la maladie, à la suite de l'observation du cas que voici.

1° Au commencement de septembre, un chien se jette sur un cheval qu'il mord. Comme à cette époque la rage était inconnue dans le pays, on tua le chien et on mit le cheval en observation

pour voir ce qui allait en advenir, Le 21e jour après la morsure, le cheval présenta des symptômes de rage; il était si excité qu'on le tua le 29 septembre; avec son cerveau, le docteur Clark, de l'hôpital de Bulawayo, inocula dans l'œil un lapin qui me fut apporté au laboratoire le 20 octobre. Celui-ci était paralysé depuis le 19 et mourut le 22 octobre. Je fis son autopsie, et avec son bulbe j'inoculai un autre lapin qui fut pris de rage 15 jours après. Nous avons là différents cas de rage en série; les animaux meurent avec des symptômes rabiques, le cheval 21 jours après sa morsure, le premier lapin 22 jours après l'inoculation du cerveau du cheval malade, le second lapin 15 jours après l'inoculation. C'est presque une expérience de laboratoire qui démontre l'existence de la rage.

2° Le 25 octobre, M. Taylor, chef commissaire des indigènes, me prie de venir voir son chien, un grand et superbe danois, que je trouve en proie à la rage la mieux caractérisée, avec l'aboiement rabique.

On l'abattit d'un coup de fusil, le cadavre m'a été apporté au laboratoire. J'ai trouvé des corps étrangers dans l'estomac. Avec le bulbe, j'inocule un lapin qui est pris de rage paralytique le 7 novembre. Je pourrais citer d'autres faits, je considère ceux-ci comme caractéristiques : la rage existe en Rhodésie.

D'où vient-elle? On dit que les indigènes se souviennent d'une maladie semblable qui existait en Rhodésie il y a environ 30 ans : puis elle aurait disparu. En 1892 et 1893, à Port-Elizabeth, dans la colonie du Cap, il y eut une épidémie de rage, importée d'Angleterre par un chien, sur lequel on remarqua les premiers symptômes peu après son débarquement. Le premier cas eut lieu en août 1892 et le dernier cas en août 1893.

Grâce aux mesures prises (destruction des chiens errants et des chiens mordus, muselière imposée à tous les chiens de la ville pendant 7 mois environ), l'épidémie a complètement disparu. On a tué 1,840 chiens. Pendant toute cette épidémie, et depuis, pas un cas de rage n'aurait été signalé en dehors de la ville. Ceci est bien extraordinaire : un chien enragé ne reste pas ainsi dans les lieux où il a été mordu.

Il est donc très vraisemblable que la maladie a été répandue dans la contrée, aux alentours de Port-Elisabeth; et, lorsque

l'épidémie s'est arrêtée dans la ville, elle a dû continuer dans la campagne. Elle a pu, si elle est restée bénigne, passer inaperçue.

La population européenne est très clairsemée dans l'Afrique du Sud; pendant la guerre des Boërs, il a été difficile de se rendre compte des maladies dont souffraient les animaux, peut-être même les hommes. Puis, dans beaucoup de pays chauds, n'a-t-on pas nié pendant longtemps l'existence de la rage : Palestine, Constantinople, Égypte, Tunisie et Algérie? Il y a je crois à cela une raison, c'est que, dans les pays chauds, si la rage mue n'est pas plus fréquente que dans les pays tempérés, la période pendant laquelle le chien est furieux paraît beaucoup plus courte. Tandis qu'en Europe un chien reste furieux pendant 3 ou 4 jours, dans les pays chauds la période de fureur me semble plus courte. J'ai vu à Bulawayo un chien qui, à midi, avait des symptômes suspects; mais, à moins d'être très exercé à reconnaître la maladie, on ne pouvait en soupçonner l'existence; il était tenu en laisse par un nègre et traversait la ville. Un peu après 3 heures il fut pris d'un accès de fureur, et à 6 heures du soir il était mort.

J'avais déjà remarqué des faits analogues en Tunisie. On comprend donc comment la rage peut être méconnue pendant de nombreuses années, jusqu'au jour où un cas bien avéré est observé par une personne compétente.

La rage en Rhodésie peut certainement venir du nord du Zambèze, mais elle peut aussi, je crois, avoir été apportée du sud; ainsi l'épidémie de Port-Elisabeth a très bien pu s'étendre et couver en quelque sorte pendant plusieurs années. Je sais bien qu'on dit avoir suivi un cas de rage depuis le Zambèze jusqu'à Bulawayo, mais ce cas est d'une époque où l'épidémie de rage semblait battre son plein. Un chien ne peut apporter que le germe d'une épidémie, et quand on voit celle-ci atteindre le chien, le chat, l'âne, le mulet, c'est qu'elle existe depuis assez longtemps.

Dans tous les cas, la rage sévit depuis plus de deux ans dans le Barotseland, au nord du Zambèze. Sovanika, roi du Barotseland, pendant le cours de 1901, a fait tuer tous les chiens de ses sujets.

D'un autre côté, la rage serait inconnue dans le Congo français.

En Rhodésie, les mesures de police sanitaire prises par le gouvernement pour lutter contre la rage dès son apparition ont été calquées sur celles qui sont en vigueur dans les autres pays; mais elles ont été complétées le 23 octobre 1902, par les mesures suivantes :

Tout propriétaire ou gardien de chien ou d'un animal pouvant avoir la rage doit, au premier signe de la maladie, détruire cet animal ou le mettre dans l'impossibilité de nuire.

Tout chien doit être à la chaîne ou muselé.

Tout chien trouvé non muselé sera détruit.

Toute personne qui vient de tuer un animal enragé doit le brûler ou l'enterrer de suite dans un lait de chaux à une profondeur de 4 pieds.

Une amende de 1,250 francs et 3 mois de prison avec travaux forcés sont infligés à toutes personnes qui ne se conformeraient pas à ces mesures.

Jusqu'à ce jour on a détruit plus de 80,000 chiens: 5,000 muselières à 6 francs l'une ont été vendues par le gouvernement aux indigènes, qui se conforment à la loi volontiers, car ils comprennent l'importance de ces mesures pour lutter contre l'épidémie.

Il est à prévoir que l'épidémie de rage ne tardera pas à diminuer; mais je crois qu'il sera bien difficile de la faire disparaître de ce continent où il y a de nombreux fauves et où la population est encore très clairsemée.

Au moment de mon départ j'ai demandé, à la requête de la chambre des mines, un adoucissement aux mesures édictées. La majeure partie des chiens errants a été tuée, si bien que les chiens qui sont pris à l'heure actuelle sont souvent des chiens de luxe, partis de chez leur maître sans muselière, ou ayant perdu celle qu'ils portaient; j'ai proposé la création d'une fourrière où les chiens pris sur la voie publique seraient conservés pendant 24 heures pour permettre à leur maître de venir les y chercher en payant une amende. C'est en effet la mesure adoptée dans tous les pays où la rage existe.

Dans un journal de Bulawayo qui vient de m'être envoyé, je lis, à la date du 31 janvier, que tout chien portant la plaque de la municipalité, mais trouvé sans muselière, pourra être rendu à son propriétaire après paiement d'une amende de

25 francs. Les chiens n'ayant pas la plaque municipale continueront à être détruits immédiatement après leur capture.

J'avais apporté des cerveaux de lapins de passage conservés dans la glycérine. J'ai toujours conservé ces flacons avec moi pendant ce long voyage sous les tropiques et sous l'équateur.

Voici les résultats des premières inoculations faites sous la dure-mère des lapins :

Cerveau resté 31 jours dans glycérine.	Inoculation à deux lapins.	Ils prennent la rage au bout de 7 de 8 jours.
Cerveau resté 35 jours dans glycérine.	Inoculation à deux lapins.	Ils prennent la rage au bout de 10 de 11 jours.
Cerveau resté 36 jours dans glycérine.	Inoculation à deux lapins.	Ils prennent la rage au bout de 8 et 10 jours.
Cerveau resté 45 jours dans glycérine.	Inoculation à un lapin.	Il ne prend pas la rage encore vivant au bout de trois mois.

On voit que la virulence disparaît brusquement entre le 36e et le 45e jour. Dans tous ces cerveaux, le virus a subi une légère atténuation qui disparaît dès le passage suivant. Dès le second passage, la période d'incubation est de nouveau de 7 jours comme toujours après les inoculations avec le virus fixe.

Voici un fait que j'ai constaté pendant mon séjour en Rhodésie : Une lapine est inoculée le 11 novembre avec un cerveau de lapin du 642e passage. Elle est prise de paralysie le 18 novembre, le 19 et le 20 elle est couchée, mais peut encore remuer. Ce même jour, à midi, elle met bas un petit bien vivant. On lui donne du lait, il le boit avec avidité. La lapine meurt le 23 novembre et le petit meurt 4 heures après sa naissance. Le 20 novembre, avec le bulbe du petit on inocule un lapin, il est pris de rage le 27 novembre. Le même jour, 20 novembre, avec l'extrémité inférieure de la moelle du même petit, on inocule un autre lapin qui est pris de rage le 29 novembre.

On voit que dans ce cas l'extrémité inférieure et l'extrémité supérieure de la moelle étaient virulentes, ce qui donne un nouveau fait positif constatant le passage du virus rabique de la mère au fœtus.

COLORABILITÉ DES BACILLES DE KOCH

DANS LES CRACHATS INCORPORÉS A DIVERSES SUBSTANCES

PAR LE Dr J. SABRAZÈS DE BORDEAUX.

Lorsqu'un crachat de tuberculeux a été abandonné tel quel dans un flacon ou incorporé à des solutions de substances chimiques diverses, antiseptiques ou autres, le bacille de Koch y peut-il être mis en évidence, à l'aide des procédés de coloration usuels, longtemps après?

Nous avons vu que des crachats bacillifères laissés pendant plus de trois ans dans un flacon bouché au liège s'y putréfient et s'y fluidifient, mais pendant tout ce laps de temps contiennent des bacilles de Koch facilement reconnaissables.

Dans un mouchoir où, depuis plusieurs mois, des crachats sont desséchés, on n'éprouve aucune difficulté à retrouver des bacilles de Koch sur les préparations obtenues avec le produit de raclage des crachats ramollis dans un peu d'eau. Mêmes résultats positifs sur des expectorations baignant depuis longtemps dans l'urine, dans un suc gastrique artificiel, dans l'alcool, le vinaigre, les solutions de sublimé, d'acide phénique, d'acide borique, de sulfate de cuivre, d'acides tannique et gallique.

Ces constatations faites par nous depuis longtemps, et pour ainsi dire au jour le jour, nous ont amené à poursuivre méthodiquement cette étude à laquelle un de nos élèves, le Dr Mathis, a collaboré activement.

Nous avons homogénisé par agitation des crachats muco-purulents, nummulaires, de tuberculeux à la période cavitaire. Ces crachats, de réaction alcaline, ayant un point de congélation de — 0,50, contenaient plus de 20 bacilles de Koch par champ de vision et d'assez nombreux microbes d'association, principalement des streptocoques. On en mélangeait 1/4 de c.c. à 5 c. c. des liquides-réactifs. Au bout de 48 heures on traitait des particules du mélange par le procédé de coloration de Ziehl-Neelsen.

Voici, sous forme de conclusion, les résultats de ces recherches :

L'action de l'eau distillée, de l'eau bouillante, de l'eau d'ani-

line, de l'eau oxygénée à 12 vol.; de la solution iodo-iodurée de Lugol, de la glycérine, de l'alcool, de l'éther, du chloroforme, du xylol, de la benzine; des acides acétique, borique et picrique (à saturation dans l'eau); phénique et salicylique (à saturation dans l'alcool); de l'ammoniaque, de la lessive de soude; du carbonate, du sulfite de soude, de l'iodure de potassium, des sulfates d'alumine et de cuivre, du chlorure de baryum (à saturation dans l'eau); du bichlorure et du cyanure de mercure (à 1/100 et à 1/1000); des mélanges de créoline et de liqueur de Van Swieten; des réactifs d'Esbach et de Flemming, ne nuit nullement à la coloration des bacilles de Koch par le procédé de Ziehl-Neelsen.

Parmi ces substances il en est qui sont employées journellement par les malades pour désinfecter les expectorations dans les crachoirs — telles l'acide acétique, l'eau d'aniline, l'alcool, les sels de mercure et de cuivre. Il n'est pas indifférent de savoir qu'elles ne gênent en rien pour la recherche des bacilles de Koch qui y baignent.

Beaucoup sont d'un usage journalier dans les laboratoires pour la fixation, la déshydratation, l'éclaircissement des frottis et des coupes : tels l'alcool, l'éther, le chloroforme, le xylol, les acides borique, phénique, picrique, etc. : leur emploi est dépourvu d'inconvénients, eu égard à la coloration des bacilles acido-résistants, tels que le bacille de Koch.

Par contre les acides azotique, chlorhydrique, sulfurique, oxalique non dilués; l'acide osmique à 1 0/0, le permanganate de potasse (4/100); le bichlorure d'étain et l'azotate de bismuth (à saturation dans l'eau); le sulfure d'ammonium, les réactifs de Boas et sulfomolybdique, ne permettent plus de retrouver le bacille de Koch dans les crachats. Cette recherche risquera fort de rester négative sur des lésions osseuses, de nature tuberculeuse, décalcifiées par les acides forts et sur les pièces fixées par l'acide osmique.

Contrarient aussi cette recherche, mais à un degré moindre, l'acide chromique (2/100), le formol du commerce, l'acide sulfurique au quart (bien entendu son action s'exerçant pendant deux jours), l'acétate de plomb (à saturation dans l'eau), les azotates d'argent et de baryum (1/100), l'alcool chlorydrique (2/100), le chromate (4 0/0) et le bichromate de potasse (à saturation dans

l'eau, la créoline, l'essence de térébenthine; le nitro-prussiate de soude et le ferricyanure de potassium (à saturation dans l'eau), la solution alcoolique de phtaléine du phénol, les réactifs acéto-picrique, de Fehling, de Kleinenberg, de Tanret, d'Uffelmann, la teinture d'iode. Ainsi l'acide chromique, les chromates et les bichromates, le formol, l'acide formique, l'alcool chlorhydrique, le réactif de Kleinenberg, les fixateurs à teneur élevée en iode peuvent contrarier la recherche du bacille de Koch dans les préparations histologiques.

La créoline, le lysol, si communément employées pour désinfecter les crachats, nuisent aussi à cette recherche.

Ajoutons en terminant que dans ce troisième groupe de substances *gênantes*, sinon *empêchantes*, nous trouvons des corps tels que le ferricyanure de potassium et le nitroprussiate de soude, au contact desquels les crachats traités par le procédé de Ziehl-Neelsen laissent précipiter des cristaux en bâtonnets fins, colorés en rouge, qui simulent des bacilles de Koch.

OBSERVATIONS

Concernant l'étude de MM. TISSIER et MARTELLY, intitulée : « Recherches sur la putréfaction de la viande de boucherie. »

PAR LE Dr A. RODELLA

Assistant à l'Institut d'hygiène de l'Université de Zurich.

Dans leur travail publié le 25 décembre 1902 dans ces *Annales*, et intitulé « Recherches sur la putréfaction de la viande de boucherie », MM. Tissier et Martelly prétendent que les anaérobies décrits par moi [1] sous les nos II et III ne sont autre chose que le *bacillus putrificus* Bienstock et des microbes appartenant à la flore du méconium.

Quoique M. Achalme ait déjà fait remarquer dans ces *Annales* (no I, 25 janvier 1903) que MM. Tissier et Martelly ont décrit sous le nom de *Bacillus putrificus coli* (Bienstock) un microbe différent de celui isolé par ce savant, je trouve quand même qu'il est de mon devoir de faire aussi les observations ci-dessous.

La liquéfaction de la gélatine compte parmi les caractères distinctifs du *Bacillus putrificus*. Cette qualité suffirait à elle seule pour distinguer de ce bacille mes bacilles nos II et III qui ne produisent jamais cette liquéfaction, *quelle que soit la durée du temps employé*. M. Bienstock m'a communiqué ceci personnellement. Je n'ai pas besoin d'entrer ici dans des détails concernant les autres marques caractéristiques de mes deux bacilles susnommés (aspect microscopique, aucune transformation du lait, etc.).

Dans un second travail [2] traitant le même sujet, j'ai déjà décrit des microbes anaérobies des selles des nourrissons qui n'ont rien à faire avec les espèces anaérobies connues (et parmi ces dernières je range certainement aussi le *putrificus* Bienstock).

Les faits que je viens de constater ici ont également été confirmés par M. le Dr Passini à Vienne, auquel j'ai envoyé mes cultures.

1. Ueber anaerobe Bakterien in normalen Säuglingsstuhle. *Zeitschrift für Hygiene*. Band XXXIX, Heft. 3.

2. Ueber die Bedentung der im Säuglingsstuhle vorkommenden Mikroorganismen mit besonderer Berückrichtigung der anaeroben Darmbakterien. *Zeitschrift für Hygiene*. Band XLI, Heft. 3.

REVUES ET ANALYSES

CE QUE C'EST QU'UN ALIMENT

I

M. DE SOTENVILLE A GEORGES DANDIN. — Soutenez donc la chose!
GEORGES DANDIN. — Elle est toute soutenue: elle est vraie.

MOLIÈRE.

La tempête dans un verre de vin déchaînée, en France surtout, par mon récit des expériences américaines sur l'alcool-aliment, montre que je me suis heurté à une certaine ignorance qui, naturellement, s'est retournée contre moi. On m'a repris sur ma façon de comprendre l'aliment, et accusé d'avoir oublié sur ce point les leçons reçues dans ma jeunesse. Ce dernier reproche est un de ceux que je sais savourer : je suis si coutumier du fait! Et puis je n'étais pas bien sûr d'avoir cru, conformément à la théorie de l'aliment de réserve, que la matière dont nous nous nourrissons vienne passagèrement faire partie de nos tissus avant de disparaître par la respiration. Cette théorie, qui nous obligeait à nous respirer nous-même, et à n'utiliser notre aliment que lorsqu'il avait pris forme vivante, me semblait quelque chose *d'énorme* comme conception, et je me demandais comment nous pouvions nous ressembler autant dans l'ensemble des jours de notre vie, si chaque jour ce qui chez nous avait charge de vie et de pensée était, dans une si forte proportion, formé de nos aliments de la veille ou de l'avant-veille.

Tout en conservant tant que j'ai vécu des doutes sur cette interprétation, je me rappelais en échange fort bien comment elle était née et s'était peu à peu répandue. Les physiologistes d'il y a quarante ans étaient embarrassés pour comprendre comment se faisait la combustion de ces aliments. Ils en avaient d'abord placé le siège dans le poumon, au point de rencontre de l'air et du sang. Puis ce fut aux points où le sang rouge devient le sang noir; c'est là, disaient-ils, dans la profondeur des tissus, dans les capillaires, qu'agissent l'un sur l'autre d'un côté les aliments, de l'autre côté l'oxygène amené par le sang. Mais comment se fait-il qu'ils ne commencent pas plus tôt, puisqu'ils sont ensemble, et qu'il n'y ait pas de combustion pulmonaire aussitôt qu'ils sont unis? Ces physiologistes étaient, sans le savoir, victimes d'un préjugé : ils étaient médusés par le souvenir du feu de leur foyer, dans lequel

nous avons en effet un combat entre deux adversaires, l'air et le bois, ou le charbon. Cette image simple leur semblait devoir être celle de toutes les combustions, et ils étaient surpris de ne pas la retrouver dans le cas de la matière alimentaire. On comprend donc combien ils furent contents de voir disparaître ce problème lorsque Bernard vint leur parler du glycogène, ce corps sucré, produit par le foie aux dépens des aliments, et imprégnant l'organisme. Plus de mystère, dirent-ils; ce qui brûle dans les tissus, ce n'est pas l'aliment ingéré, c'est le glycogène que cet aliment a formé, et celui-ci ne brûle dans le muscle que parce qu'il est là, conformément à l'image classique, attendant l'oxygène qui lui manque.

Vainement on objecta qu'il y avait aussi du glycogène dans le sang et que, par conséquent, le problème restait le même. On étendit la théorie au lieu de s'arrêter à résoudre l'objection; on montra, ce qui n'est pas difficile, que le glycogène des tissus pouvait aussi provenir des corps gras, des matières albuminoïdes. Des animaux qu'on avait ramenés, soit en les affamant, soit en les épuisant de travail, au minimum — ou même quelquefois à la disparition complète — de leur glycogène pouvaient reconstituer leur provision lorsqu'en supprimant le sucre de leur alimentation, on y introduisait des corps gras ou bien de la viande, et l'argument parut excellent. Après une minute de surprise, la chimie, consultée, vint répondre qu'elle ne contredisait rien de son côté, souscrivait à toutes ces transformations, et même que le problème de faire du glycogène avec un corps quelconque avait des centaines de solutions théoriques, car on fait ce qu'on veut avec des formules. Bref, et sans que j'insiste, voilà le principe et le développement naturel d'une interprétation qui voit dans l'aliment surtout l'aliment de réserve, et qui lui demande d'avoir fait partie à un titre quelconque des tissus de l'animal avant de disparaître.

Cette antipathie instinctive vis-à-vis d'une théorie ainsi faite explique peut-être comment je me suis tenu au courant des objections qu'on pouvait lui faire. Pour abréger, dans cette revue où je voudrais faire court, je ne viserai que quelques-uns des travaux dont elle a été l'objet : les plus importants, à mon avis, sont ceux dans lesquels on a essayé de profiter de cette manière d'animalisation de la matière alimentaire pour essayer de la retrouver au milieu des tissus. Donnons à un animal une matière différente de sa matière grasse normale. Après l'avoir au préalable amaigri par l'abstinence ou par l'exercice, si cette masse de matière grasse nouvelle laisse tous les jours un peu de sa substance dans les tissus de l'animal, il ne semble pas douteux qu'en reprenant la matière grasse de l'animal après qu'il est revenu à la santé, et en l'analysant, nous y trouverons des dissemblances avec la matière grasse normale. Dans cette recherche, que je ne détaille pas

autrement, on voit bien que l'animal n'aime pas à changer de matière grasse, et conserve obstinément la sienne, bien qu'il ne puisse pas empêcher d'y entrer une partie des corps gras étrangers dont il se nourrit.

De même, si, au lieu de lui donner du sucre pour fabriquer du glycogène, on lui fournit d'une façon réguliere une nourriture composée d'autres aliments ternaires, c'est toujours du glycogène qu'on retrouve dans ses tissus, et non pas, comme on aurait pu le croire, des glycogènes divers ayant conservé quelque trace de la structure des composés ternaires qui auraient servi à les fabriquer. Enfin, à propos des aliments quaternaires, on a vu tout récemment, sur une oie nourrie avec de la *zéine* (matière albuminoïde particulière provenant du maïs, qui diffère des autres en ce qu'elle est soluble dans l'alcool et ne donne pas de *lysine* dans une destruction ménagée), la substance musculaire de cette oie être la substance normale de l'oie sans trace sensible de *zéine*. Quand on y songe, on ne trouve rien de surprenant à ce que des animaux ainsi traités mettent une pareille obstination à conserver leur nature; et l'on se demande avec un peu d'inquiétude ce qui arriverait si notre pauvre humanité changeait avec tant de facilité sous l'influence de l'aliment, et si les habitants des régions polaires, nourris d'huiles, ressembleraient encore autant qu'ils le font aux habitants des régions équatoriales ou tempérées.

Non, en vérité, l'aliment ne joue pas un tel rôle dans notre existence, et nous allons voir en effet que nous le côtoyons bien plus que ne le laissons se fondre en nous.

II

Ici, j'ai besoin d'entrer dans quelques détails préliminaires : il a toujours été plus facile et plus court de démolir que de rebâtir. Je voudrais d'abord me demander ce que c'est qu'un aliment et comment il est fait.

En nous posant cette question, nous trouvons d'abord cette harmonie naturelle qui fait que nous sommes bien obligés de nous contenter des aliments que les végétaux nous fabriquent. Dans le monde, tel qu'il est composé, la végétation, aidée de l'action solaire, fabrique peu à peu tout un clavier de substances, dont presque toutes les touches alimentent le monde animal chargé de les détruire en les ramenant à la forme dont ils sont partis : eau et acide carbonique. Le monde végétal fabrique, le monde animal dégrade et détruit. Dans l'ensemble, il y a un travail de dislocation qui double et défait le travail de construction, et ces deux travaux sont si bien superposés que, si on connaissait l'un on connaîtrait aussi l'autre.

Un végétal que nous arrachons après qu'il a passé quelque temps dans la terre, une salade, une betterave, par exemple, nous apporte un travail déjà fait, représenté par l'ensemble de ses matériaux. Ce qui nous frappe surtout, ce sont les éléments qui s'y sont différenciés, qui ont pris la forme de cellules, ou bien d'amidon, ou bien encore celle de sucre. Quand la plante en est là, quand nous découvrons que nous pouvons en tirer du sucre ou de la fécule, nous jugeons que, chez elle, le travail s'achève, que le moment de l'utilisation et de la récolte va venir. Nous remplissons nos caves ou nos greniers avec les caves ou les greniers que la prévoyante nature avait multipliés sur ou dans le sol, et tout cela nous semble si naturel que la préparation silencieuse des réserves nous paraît l'acte essentiel de la culture.

C'est que, par ignorance, nous avons élagué de notre esprit toute une période préliminaire, toute celle qui s'étend entre le point de départ, eau et acide carbonique, et les produits aussi complexes que le sucre. Il y a dans le végétal toute une série de corps intermédiaires entre le sucre et l'acide carbonique, des alcools, des aldéhydes, des acides fixes ou volatils, des corps gras, etc., auxquels les chimistes ont fait de loin en loin l'aumône d'un travail, et qu'ils ont en somme négligés, parce que ces corps n'étaient pas abondants. Pourquoi, après tout, n'étaient-ils pas de l'importance de l'amidon et du sucre? En réalité, les choses étaient ce qu'elles devaient être. Les matériaux de réserve formaient la réserve, parce que la nature leur avait fait une molécule résistante difficile à attaquer; c'est pour cela que, comme aliments, ils ne disparaissaient pas sans quelque difficulté, correspondant à cet embaumement protecteur. Au contraire, les corps intermédiaires dont nous parlions plus haut sont plus rapides dans leur évolution, ne font qu'apparaître et disparaître à leurs diverses stations, et doivent comme conséquence être comptés comme rares, si rares même parfois qu'ils deviennent presque évanescents, et qu'il faut admettre leur existence sans qu'on en découvre des quantités bien sensibles. C'est le cas pour l'alcool méthylique, découvert dans la végétation par M. Maquenne, ou pour l'alcool ordinaire, si souvent rencontré dans les tissus en plus petites quantités. Si on en trouve si peu, c'est non pas que la qualité alimentaire leur manque, mais qu'elle est plus développée que chez leurs congénères plus résistants. Leur importance ne se mesure pas à leur quantité, et nous voyons bien que, du moment qu'ils apparaissent dans la vie végétative comme produits intérimaires doués d'une certaine stabilité, ils méritent également d'arrêter l'attention.

Dans cette vue rapide, je n'ai fait jusqu'ici aucune distinction entre les aliments azotés ou non azotés. Je me suis placé en face d'un végétal qui grossit, et j'ai examiné les divers corps qu'il donne, tant

ceux qui font des apparitions et des disparitions rapides dans les tissus que ceux qui s'y installent pour une certaine période et manifestent dès leur origine leur intention de durer. Il y a une partie animale dans l'aliment qui se fabrique ainsi, s'il y a une part végétale prédominante, et j'aurais pu me supposer de même, dès le début, en présence d'un animal qui grossit aux dépens de sa nourriture végétale, car, au fond, l'introduction de la matière albuminoïde ne change rien à notre concept. L'expérience nous révèle entre l'acide carbonique et l'eau, formes les plus brutes de la matière végétale, et l'amidon ou la cellulose, toute une série de formes réalisables, de plus en plus complexes et de stabilités variables, qui, présentes pendant la construction du végétal, doivent reparaître au moment où le végétal digéré se disloque. Ces formes intermédiaires entre l'acide carbonique et le sucre ne peuvent pas être très nombreuses, car elles doivent être réalisées par des groupements nouveaux donnés au maximum aux 48 atomes d'un sucre en C^{12}. Avec une matière albuminoïde, le même raisonnement nous conduit aussi à l'idée de formes nouvelles de construction et de digestion, réalisées par des groupements nouveaux des éléments de la molécule albuminoïde, et, s'il est vrai, comme je crois l'avoir montré dans mes leçons de l'an dernier, auxquelles celle-ci fait suite, que la structure de la matière albuminoïde est celle d'une cellulose ou d'un sucre azotés, le nombre des molécules aux dépens desquelles doivent se faire des groupements nouveaux reste encore bien restreint. Les deux raisonnements, l'un relatif au sucre, l'autre aux aliments azotés, restent collés l'un sur l'autre sur tout le champ qui leur est commun.

Nous pouvons donc dire, dans un cas comme dans l'autre et comme conclusion de tout ce qui précède, que l'aliment est l'une des formes de digestion que l'on relève pendant la destruction physiologique d'un végétal ou d'un animal; la cellulose, la fécule, le sucre, l'alcool, l'acide lactique, la glycérine, etc., sont des aliments successifs qui se dégagent peu à peu du bloc alimentaire qu'on a appelé aliment jusqu'ici. De même la matière albuminoïde revêt, en se disloquant, des formes qui sont aussi des aliments, et dont les derniers termes peuvent être simples, provenant du reste de dérivations analogues à celles qui fonctionnent avec les aliments ternaires. Dans l'ensemble, il est trop clair que toute une face du problème nous a échappé jusqu'ici, que nous l'avons laissé à ses débuts, que nous avons eu tort de croire qu'il perdait tout intérêt lorsqu'il cessait de pouvoir être suivi au microscope, et qu'à côté de ses fragments classiques, sucre, amidon, muscle, etc., il fallait étudier ceux dont non seulement on ignorait la digestion, mais auxquels on contestait leur qualité alimentaire.

III

C'est ce que sont venues nous révéler les études faites sur la nutrition des microbes. A l'origine, chacune des espèces étudiées, par exemple la levure de bière, nous apparaissait comme un végétal, digne d'être étudié précisément pour la bizarrerie de ses allures. La levure était, par exemple, l'être qui fabriquait tout l'alcool formé à la surface du globe. Il a fallu lui enlever ce rôle, à mesure qu'on étudiait d'autres ferments; puis il a fallu en faire autant pour ce qui avait singularisé les autres ferments classiques, et on a si bien fait, qu'aujourd'hui, les microbes valent, non par ce qu'ils peuvent avoir de spécifique, mais par ce qu'ils ont de commum à toutes les cellules vivantes.

Par là, il sont rentrés dans le courant commun, avec cette spécialité pourtant encore que, tout en détruisant dans l'ensemble les matières alimentaires comme le font les autres cellules, ils savent s'arrêter en route et se succéder les uns aux autres, pour accomplir ce que d'autres cellules peuvent faire à elles seules. C'est ainsi que la levure de bière s'arrête à la formation de l'alcool, que d'autres cellules transforment ensuite; c'est de même ainsi que le ferment lactique s'arrête à l'acide lactique, le ferment acétique à l'acide acétique, de sorte qu'en résumé, nous nous trouvons avoir pu partager en plusieurs lots le problème de la destruction de la molécule sucrée, en étudiant successivement la vie de chacun de nos microbes. De là ressort une série de notions fécondes que je ne peux qu'énumérer :

1° Les microbes se trouvent ainsi jalonner un grand nombre de chemins ouverts à l'aliment pour passer du degré maximum de complication au degré maximum de simplicité, c'est-à-dire à l'état d'eau et d'acide carbonique. Mais aucune de ces routes ne comporte plus de quatre ou cinq stations pour les aliments ternaires. Pour les aliments quaternaires, le chiffre est un peu plus grand, et mal connu, à cause de notre ignorance des produits de destruction de la matière albuminoïde; mais, sûrement, il n'est pas gros, pour cette raison d'ordre général, et applicable aussi aux substances ternaires, que la molécule du corps qui détruit n'est jamais compliquée, et que les stations qu'elle fait sur sa route sont celles où elle peut rencontrer un peu de stabilité.

2° Le passage de ces groupements l'un à l'autre se fait à l'origine par l'action des diastases. Nous connaissons les cellulases, qui détruisent la cellule en lui enlevant sa structure; les amylases et les dextrinases, qui font tomber de même au niveau des sucres les divers amidons; la sucrase qui dédouble le saccharose en deux sucres en C^6 ; la zymase, qui fait avec ces sucres de l'alcool et de l'acide carbonique; les diastases tout récemment découvertes par MM. Büchner et Meisen-

heimer qui font, avec ces mêmes sucres, de l'acide lactique ou de l'acide acétique ; nous trouvons de même, dans le monde des matières albuminoïdes, des diastases toutes pareilles, dont les unes, soumises à une révision en ce moment très attentive, ont pour objet d'enlever à ces substances toute trace de structure et d'en faire des liquides : ce sont la pepsine, la trypsine, la caséase, etc. ; à côté de celles-ci, les plus récentes dans la science sont les diastases qui agissent à la façon de la zymase en transformant l'ornythine en putrescine, la lysine en cadavérine, de la tyrosine en oxyphényléthylamine, en les privant d'une molécule d'acide carbonique et leur faisant ainsi subir une sorte de fermentation alcoolique classique. Nous sentons très bien en ce moment que nous sommes, de ce côté de la science, au début d'une ère féconde, et, quand nous aurons terminé de ce côté, il nous restera à faire une besogne qui commence à peine : je veux dire l'étude de ces diastases oxydantes dont le rôle dans la digestion est dix fois supérieur à celui des diastases que nous venons d'énumérer.

3° C'est que, si en théorie les bactéries anaérobies peuvent être mises en balance avec les aérobies, dans la pratique, ce sont les dernières qui l'emportent de beaucoup, et qu'on peut même dire, en forçant un peu la note, qu'il n'y a pas de vie bactérienne anaérobie. Ce n'est qu'au contact de l'air qu'il y a multiplication active et destruction de l'aliment. Au regard de cette vie aérobie, l'espèce bactérienne devient presque indifférente. Les termes auxquels elle aboutit sont à peu près les mêmes partout. Les acides gras, par exemple, sont des produits de fermentation presque universels, presque autant que l'acide carbonique qui les accompagne.

4° Il y a pour cela des raisons faciles à saisir. Comme toutes les cellules vivantes, celles-ci sont surtout préoccupées de se différencier elles-mêmes; quand l'une d'elles est ensemencée dans un milieu favorable, quel qu'en soit le niveau sur l'échelle de destruction, elle se fait dans ce milieu tout ce qui lui est nécessaire. Comme les cellules des animaux supérieurs, elle sécrète d'abord tout ce qu'il lui faut; elle se donne de la matière albuminoïde, si on ne lui en a pas fourni, à la condition qu'on lui donne un peu d'ammoniaque. Elle pourrait de même se faire de la matière ternaire si on la lui refusait, en satisfaisant du reste à ses autres besoins. La levure de bière se donne du glycogène; le vibrion du tétanos se donne sa toxine; bref, la cellule vivante ne songe qu'à elle, et on ne saurait trop lui en vouloir; celle de notre intestin se préoccupe de sa santé, pas de la nôtre; mais, pour les résidus de sa vie, elle s'en désintéresse non moins naturellement, et on peut dire qu'elle est fort indifférente à la besogne de destructeur qu'elle accomplit dans le monde.

5° Envisagé à ce point de vue, l'ensemble des vies microbiennes

disparaît, eu faisant place à une cellule microbienne-type, laquelle à son tour ne diffère pas de l'ensemble des cellules du végétal ou de l'animal. Toutes ces cellules sont différenciées et ont chacune leur histoire, lorsqu'on envisage leur forme ou leur fonction. Quand on songe à leur action sur la matière alimentaire, aux résidus qu'elles laissent, à la façon dont elles s'en débarrassent, on s'aperçoit qu'elles obéissent aux mêmes lois et aux mêmes formules, qu'on peut par conséquent en faire abstraction, et substituer aux théories, dans lesquelles elles avaient une place, une autre théorie plus générale, dans laquelle on les oublie.

IV

Nous voici en effet en présence d'une conception dans laquelle l'aliment vaut pour nous par la quantité de chaleur qu'on peut en tirer, telle, par exemple, que celle qui se révèle lorsque, brûlant un gramme de l'aliment dans un calorimètre, on cherche le nombre d'unités de chaleur ou de calories que développe sa combustion. Chacune des matières particulières qui servent à l'alimentation : l'albumine, la caséine, le corps gras, la cellulose, l'amidon, l'alcool, les acides fixes, sortent de cette étude avec un coefficient qui définit leur valeur comparative; et de cette notion ressortent tout de suite quelques faits importants.

Représentons-nous l'aliment comme une sorte de masse homogène, et voyons comment nous allons en faire sortir la chaleur qu'elle contient et qu'elle donne en se transformant. Les premières transformations sont dues à des actions de diastases qui font perdre à la masse son homogénéité. C'est en se dédoublant, et moyennant une adjonction d'eau, que la cellulose, la dextrine, l'amidon se divisent en sucres variés, et nous pouvons nous représenter ces segmentations contemporaines ou successives comme des coupures subies par le tronc principal qu'on pourrait représenter par les premières subdivisions d'un système radiculaire.

Plus loin, ces mêmes grosses racines fournissent peu à peu des racines secondaires qui correspondent à l'intervention d'autres diastases, la sucrase, par exemple, ou la zymase, qui, soit par le même mécanisme de dédoublement que les premières, soit par l'expulsion d'un peu d'acide carbonique, augmentent le nombre de subdivisions de la racine et font que le tronc principal se trouve là réduit à un certain nombre de rameaux. Jusqu'ici, toutes ces transformations se sont faites en vertu de forces intérieures : l'oxygène n'y a pas paru, et la région tout entière dans laquelle opèrent ces diastases représente la région anaérobie des phénomènes de la digestion.

Vient alors une autre région que nous pouvons appeler « aérobie » pour la même raison, dans laquelle l'oxygène est mis en œuvre par les

oxydases. Celle-ci est moins connue. Les diastases oxydantes que l'on commence à connaître sont chargées surtout de l'oxydation des produits aromatiques, et on n'en connaît pas encore de bien caractérisées pour la combustion des matières alimentaires. Tout bien pesé, il faut accepter, je crois, comme très probable, l'existence de ces dernières diastases oxydantes, et c'est même grâce à leur présence dans les tissus qu'on s'explique comment le sang peut si bien convoyer ensemble l'oxygène de son hémoglobine et la masse combustible des aliments sans qu'il y ait combustion. Contrairement à l'opinion courante, il est probable que l'oxygène ne suffit pas et la matière oxydable non plus. Le sang rouge ne devient noir que dans les tissus, là où il y a la diastase nécessaire pour activer l'action du phénomène, nécessaire peut-être pour surexciter l'action de l'hémoglobine, qui, au fond, est une diastase.

Dans tous les cas, que l'action soit diastasique ou simplement d'ordre chimique, le mode de représentation que nous lui avons donné persiste. A chaque segmentation naturelle des faisceaux radiculaires correspondent une transformation et une production de chaleur plus grande lorsque l'oxygène libre intervient, et ainsi nous arrivons à une sorte de chevelu dont les dernières ramifications portent toutes des molécules d'urée, d'eau et d'acide carbonique. C'est cette dernière partie qui est la moins connue; c'est de même, en prenant les choses en sens inverse et en envisageant la production de l'aliment par le végétal, les premières parties du phénomène qui restent pour nous obscures, malgré les quantités de chaleur qui y sont naturellement absorbées.

La création de l'aliment est presque complète lorsque nous commençons à l'apercevoir : par exemple, dans les premières portions de sucre ou d'alcool méthylique. Et nous serions fort embarrassés si la microbiologie n'avait répandu pour nous quelques lumières sur ces régions importantes et obscures.

V

Voilà que nous sommes arrivés cependant à voir qu'un aliment, en se détruisant pour servir, obéit à des lois indépendantes de la cellule qui l'utilise. Cela veut dire que nous faisons une théorie de l'alimentation en la rattachant à d'autres lois que celles auxquelles jusqu'ici nous la croyions soumise. Nous en étions restés à la théorie de l'aliment de réserve, en rapport intime par conséquent avec les tissus. Nous voici en présence d'une doctrine dans laquelle cet aliment devient source de chaleur, et tombe au rang de combustible, pour tout dire en un mot. Toute digestion, que ce soit celle de l'éléphant, que ce soit celle du microbe, a devant elle une masse de matière utilisable dont elle retient une partie en l'appropriant à ses besoins, et dont l'autre lui

sert à faire de la chaleur et à créer le mouvement nécessaire à la vie d'ensemble.

On comprend d'autant moins que la science ne se soit pas plus vite engagée dans ces voies qu'elle est, même dans ce moment, visiblement un peu embarrassée quand elle parle de la chaleur vitale. A quoi est due cette température à peu près constante pour chaque espèce, différente pourtant d'une espèce à l'autre, et qui, dans tous les cas, est, en apparence au moins, la meilleure pour les besoins de l'organisme? Le sentiment général en fait une résultante de tous les effets fonctionnels de l'aliment, et même, lorsque le muscle qui se contracte s'échauffe, on se demande si par hasard ce n'est pas le muscle qui produit la chaleur? Si l'on admet, au contraire, que la production de chaleur est un effet primordial, qu'elle l'est parce que le besoin qu'a une cellule de sa température normale est le plus grand de ses besoins physiologiques, que cette chaleur est en outre une source vive à laquelle elle puisera sans peine pour ses mouvements, pour son travail, voilà immédiatement l'horizon qui s'éclaire.

On n'a plus besoin, en effet, de chercher des mystères dans un muscle qui travaille. Le muscle est un appareil qui transforme naturellement de la chaleur en travail. Il représente une machine à vapeur quelconque, dans un atelier chauffé à la vapeur, comme l'organisme. Il suffit de tourner une manette pour que le moteur se mette en mouvement. Qu'il s'échauffe lui-même pendant qu'il travaille, c'est le sort commun. Mais il n'y a jamais le moindre doute sur l'origine de sa force. Et ainsi, de ce côté, tout est parfaitement harmonisé.

D'autres points s'éclairent d'eux-mêmes. Tant qu'on a laissé au mot d'« aliment » son sens étymologique, c'est-à-dire, qu'on a cru qu'il passait par l'organisme avant de disparaître, on pouvait se demander pourquoi, pour l'homme par exemple, il y a besoin, pour nourrir un corps formé surtout de matières azotées, d'un excédent notable d'aliments ternaires, féculents, sucres, pour maintenir ce corps en état. Instinctivement, et aussi pour suivre l'expérience, on disait que c'était à cause du travail qui, en effet, peut se contenter de ces aliments ternaires. Mais nous verrons tout à l'heure qu'on avait fortement exagéré le prélèvement fait par le travail. Nous sommes maintenant plus sûrs de notre évaluation, et cette difficulté n'existe plus. L'excédent est fait pour le chauffage de l'usine, plus exigeant comme quantité que la nourriture proprement dite de ses habitants.

Je rencontre ici une objection qui, pour quelques esprits, serait presque une difficulté : on pourrait se dire qu'on peut rêver un état de choses mieux ordonnancé que le nôtre, dans lequel nous sommes obligés de faire circuler à grands frais dans le même canal des matériaux ayant des destinations si diverses, dont quelques-uns

vont devenir de la matière vivante, et dont les autres n'ont qu'une puissance de chauffe. Je conviens qu'il n'est pas du tout économique de faire brûler pour cela de la viande ou d'autres aliments chers. Il y a du progrès à attendre d'études faites dans cette direction. Je ne crois pourtant pas qu'elles aboutissent jamais à réduire un repas à quelques pilules. Il faudra toujours qu'il y ait un aliment complet dans le canal digestif, parce qu'il y a tous les jours une centaine de grammes de matière ayant fait partie de l'organisme, et qui doit être remplacée au moyen de prélévements faits en tous ses points. Il faudra en outre toujours que le combustible soit en quantité bien supérieure à celle de l'aliment. Mais rien ne nous oblige à croire que les choses se fassent *au mieux*, comme on dit à la Bourse, et l'expérience des pays chauds, de même que celle de l'été, nous apprend, quand on y réfléchit, que le soleil, lorsqu'il arrive sur le marché, est un aliment qui permet de modifier utilement la quantité et la qualité des autres.

VI

Il ne suffit pas à une doctrine d'être vraisemblable ; il faut qu'elle soit vraie, et obéisse à certaines lois de chiffres tirées de son principe. Celle-ci est plus facile à étudier qu'une autre à ce point de vue, puisqu'elle a cessé, en quelque sorte, d'être une loi physiologique, pour devenir une loi physique dans laquelle sont seules visées des quantités mesurables de chaleur.

L'aliment en emporte une certaine quantité avec lui. Mesurons-la au moyen de cet admirable instrument de travail qui s'appelle la bombe calorimétrique de Berthelot. L'individu nourri vit, travaille, accomplit toutes ses fonctions. Si nous mesurons tout ce qui sort de lui, (respiration, transpiration, excrétions, urine), si en outre nous évaluons la chaleur qu'en sa qualité de petit poêle ambulant il répand dans l'air ambiant ; si, enfin, nous saisissons au passage tout le travail qu'il fournit, en le transformant en calories au moyen de l'équivalent mécanique de la chaleur, toutes ces quantités ainsi récoltées devront composer un total égal à l'apport de chaleur fait par l'aliment. Si cette coïncidence se réalise à un degré de précision comparable à celui des divers éléments du tout, nous conclurons non seulement que la théorie mécanique de la chaleur s'applique aux phénomènes qui se passent dans l'organisme, ce qui n'était guère douteux, mais surtout que nous connaissons bien tous les usages auxquels sert l'aliment.

Si, au contraire, nous ne trouvons pas l'emploi de toute la chaleur apportée, et s'il nous est impossible de trouver nulle part (engraissement du sujet, état de fièvre, etc.) l'explication de cette différence, c'est

que l'aliment produira quelque part un effet inconnu qu'il faudra rechercher.

On reconnaît tout de suite ici le programme d'expériences pour la première fois, je ne dis pas dressé, car il est assez ancien dans la science, mais réalisé dans toute sa plénitude par la Commission américaine. J'en ai indiqué les lignes principales, je n'y reviendrai pas. Je me contente de dire qu'il n'existe pas dans la science, et qu'on n'y verra pas probablement de longtemps, un ensemble plus parfait d'un problème poursuivi avec une entente si parfaite des moyens et du but. Les physiologistes y verront toujours un mémorable exemple de la façon dont une question scientifique peut être posée et résolue.

Quelques mots vont me suffire pour résumer les résultats. Voici un opérateur ayant fait dans l'appareil quatre expériences, ayant duré en tout treize jours, c'est-à-dire que, pendant treize jours, il a mené une existence pendant laquelle rien n'a pénétré en lui comme aliment qui n'ait été connu comme quantité et qualité, et qu'il n'est rien sorti de lui qui n'ait été noté au passage encore comme quantité et qualité, y compris la chaleur qu'il a laissé rayonner à l'extérieur. Par suite des précautions prises, cette vie en cage et cette surveillance étroite ne lui ont pas nui. Aucune expérience n'a été jugée bonne si, du commencement à la fin, le poids n'était resté stationnaire ou à peu près, de façon qu'on n'a même pas à se poser la question de savoir ce que l'opérateur avait perdu ou gagné, de la graisse ou du muscle. On voyait, au sortir de l'appareil, un homme identique à celui qui y était entré; et, comme celui-ci, dans ces expériences, n'avait pas travaillé, d'une façon visible du moins, et avait conservé le plus possible son énergie intellectuelle, il n'y avait avec lui qu'à faire le total de ce qui y était entré et de ce qui en était sorti. Eh bien, le total utilisé de sa masse alimentaire aurait pu donner par jour, si l'aliment avait brûlé dans une bombe calorimétrique, un total de 2,190 calories; le total de ce qui en était sorti se trouvait être de 2,221, ce qui veut dire, qu'à un peu plus d'un centième près, la combustion physiologique s'était faite dans l'organisme comme la combustion chimique dans la bombe.

Dans cette vie tranquille, introduisons maintenant, par intervalles un travail qui, dans l'espèce, représentait huit heures par jour d'énergie dépensée sur un motocycle, dans lequel toute la force versée prend la forme d'un courant électrique qui se dépense lui-même dans une lampe Edison. Cette méthode a l'avantage que toutes les résistances de l'appareil s'y transforment en chaleur, qui est emportée par la ventilation et vient s'y ajouter à la chaleur versée par l'opérateur lui-même. On peut donc mesurer la quantité totale de chaleur produite par le travail et la faire entrer en compte. Voici le compte d'un autre

opérateur qui a fait cinq expériences, c'est-à-dire qui a passé 15 jours dans l'appareil. Le total de ses aliments aurait pu lui fournir en moyenne, par jour, 3,660 unités de chaleur; or on a trouvé 3,451 calories comme total s'il était resté en repos, et 220 correspondant à son travail journalier : soit en tout 3,671 calories au lieu de 3,660; l'approximation est encore plus grande que tout à l'heure.

On voit, en passant, combien est faible le nombre de calories absorbé par le travail, qui dépasse pourtant 90,000 kilogrammètres, et aussi combien se trompaient les physiologistes qui versaient généreusement dans la dépense de travail quelquefois 50 0/0 de la chaleur apportée par l'aliment.

Dans ce cas, la dépense totale est de 220 unités sur 3,660, c'est-à-dire de 6 0/0 environ. On voit aussi combien il paraît improbable que l'utilisation de l'aliment se fasse autour du travail comme pivot. C'est un trop piètre élément et, évidemment, encore ici, c'est le combustible qui l'emporte.

Nous pouvons enfin poser à notre appareil une dernière question qu'il résoudra avec la même facilité. Nous venons de voir que chacun de nos opérateurs avait dû se créer à lui-même, par tâtonnement, et par l'expérience, un régime normal qui était pour lui le régime hygiénique et qu'il pouvait supporter pendant des périodes assez longues, sans maigrir ni grossir, en restant identique à lui-même. On peut même dire qu'une fois ce régime acquis, l'expérience était terminée sans qu'il fût nécessaire d'un appareil quelconque, puisque cet appareil n'avait pas d'autre but que de découvrir un accord matériel entre ce qui se passe dans l'organisme et ce qui se passe dans la nature morte. Cet accord est déjà entré dans la conscience générale; on a été très heureux de le retrouver, comme une notion de fait, dans les nombres de M. Atwater, mais il n'eût fait question pour personne. Partons en effet de cette notion de *régime hygiénique*. Nous pouvons très bien lui demander quel rôle jouent les divers éléments dont il est composé, en en supprimant une certaine partie qu'on remplacera par une autre prise en quantité telle que le résultat soit le même. Remplaçons par exemple une partie de ses matériaux ternaires, de ses féculents, de son beurre par de l'alcool en quantité telle que cet alcool y apporte la même quantité de force, la même quantité d'énergie calorifique que les féculents ou le beurre enlevés, et laisse au régime toute sa valeur hygénique : c'est dire que la substitution doit se faire par quantités isodynames, si les idées sur lesquelles nous venons d'insister sont bien les idées maîtresses du phénomène. L'expérience tentée a réussi tout de suite, et, comme on pouvait s'y attendre, la nature s'est montrée complètement indifférente

aux changements de régime dans lesquels on avait remplacé les féculents et le beurre par un poids d'alcool donnant en brûlant la même quantité de chaleur. L'expérience ayant été faite comme tout à l'heure, tantôt avec le régime du repos, tantôt avec le régime de travail, l'opérateur a vécu dans le même hygiène, s'est retrouvé avec son égalité de poids, pendant une expérience qui a duré dix jours au repos, et dix jours au travail. Au repos, ses aliments lui ont apporté 2,191 unités de chaleur; il en a dégagé 2,221 pendant chacune de ces dix journées : chiffres qui sont à peu près exactement ceux de tout à l'heure, lorsqu'il mangeait tranquillement son beurre et ses féculents, remplacés par l'alcool. Dans le régime de travail, avec l'alcool comme boisson, les aliments lui ont apporté 3,690 calories par jour; on en a retrouvé 3,461, dégagées par le patient sous forme de chaleur, et 215 calories restituées par lui en travail : ce qui donne un total de 3,676; les chiffres sont encore les mêmes. Donc, l'alcool est un aliment.

J'ai quelque honte d'insister. N'est-il pas clair que nous sommes ici sur un terrain solide, que nos idées sont nettes, que le parfait accord entre les prévisions et les réalités plaide pour notre cause, et qu'on ne peut s'expliquer comment tant d'hommes distingués, surtout en France, s'arc-boutaient contre des vérités si évidentes, et même se fâchaient contre elles? La vérité ne se fâche pas, elle : elle s'est amusée. Elle s'est même montrée particulièrement spirituelle dans l'espèce; elle a montré aux anti-alcoolistes qu'ils consommaient de l'alcool sans le savoir, et, cette fois encore, la démonstration a suivi de près l'énoncé du fait. Tout ce qui précède revenant à dire que l'alcool est un stade du progrès de démolition que subit la molécule sucrée, il était impossible que l'alcool n'apparaisse pas pendant la digestion du sucre, et que par conséquent, de l'alcool ne soit forcément brûlé dans la profondeur des muscles même de ceux qui le repoussaient le plus religieusement en nature. Ce fait, prédit par la théorie, est parfaitement d'accord avec l'expérience. Et, tout récemment, MM. Stoklaza et Czerny de Prague ont découvert, dans les tissus vivants, une diastase, pareille à la zymase de Büchner, qui transforme en alcool ce que la digestion lui présente de sucre. Les gens audacieux, dont je suis, estiment que cela a été fait pour quelque chose.

E. Duclaux.

Sceaux. — Imprimerie Charaire.

Le Gérant : G. Masson.

17me ANNÉE MAI 1903. N° 5

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

Alimentation azotée d'une algue
LE « CYSTOCOCCUS HUMICOLA »

Par le Dr P.-G. CHARPENTIER

Au cours d'une étude sur le *Cystococcus humicola*, j'ai rencontré l'histoire de ses relations avec l'azote. Ces algues, qui se cultivent comme les microbes, sont des êtres un peu paradoxaux, végétaux supérieurs en ce qu'ils ont de la chlorophylle qui leur sert, végétaux inférieurs en ce qu'ils peuvent se passer de lumière, et vivre aux dépens d'éléments très complexes. Je voudrais dire ici, brièvement, ce que j'ai appris de leur relations avec l'azote.

Il est pour les végétaux, quatre sources possibles d'azote : l'air, les nitrates, les sels ammoniacaux et les matières organiques.

J'étudierai avec soin l'assimilation par le *Cystococcus* de l'azote libre, et plus succinctement celle des autres formes d'azote.

I

ASSIMILATION DE L'AZOTE LIBRE

Je ne résumerai même pas les nombreux travaux et les multiples discussions auxquelles a donné lieu la question de la fixation de l'azote par les végétaux, me contentant de rappeler qu'elle a été résolue par l'affirmative pour un certain nombre de microbes, et par la négative pour les plantes supérieures; en ce qui concerne les algues inférieures, elle reste encore en suspens.

Franck[1] admit un des premiers que certaines plantes vertes pouvaient prendre de l'azote à l'atmosphère, mais sans apporter de preuves convaincantes à l'appui de cette hypothèse.

MM. Schlœsing et Laurent[2], dans leur beau travail sur la fixation de l'azote par les légumineuses, ont observé que des sols

1. Franck, *Lehrb. der Bot.*, 1892.
2. Schlœsing et Laurent, *Ann. Inst. Past.*, 1892, p. 65.

qui se recouvrent de mousses et d'algues vertes inférieures peuvent fixer l'azote de l'air, tandis que des sols témoins, dans lesquels pareille végétation ne se fait pas, sont incapables d'effectuer une telle fixation; ils en ont conclu que certaines plantes vertes inférieures, notamment les algues, peuvent trouver dans l'atmosphère une partie de leur azote. Leur conclusion n'est pas à l'abri de toute critique, parce que leurs expériences n'ont pas été faites à l'abri des microbes du sol, dont on sait aujourd'hui que certains peuvent assimiler l'azote gazeux; rien ne prouve donc que dans un sol couvert d'algues et renfermant nécessairement de nombreuses bactéries, l'enrichissement en azote soit plutôt le fait des algues que des bactéries. Il faut de toute nécessité éviter la présence de ces dernières dans les cultures.

C'est ce qu'a fait M. Kossowitsch [1] dans des expériences dont il s'est autorisé pour conclure que le cystococcus humicola cultivé en culture pure, à l'*abri de tout microbe*, est incapable de fixer l'azote gazeux, ce qu'il fait au contraire très nettement quand il vit en symbiose avec certaines bactéries. Les chiffres obtenus par M. Kossowitsch, dans ses dosages d'azote, semblent probants; je vais cependant montrer que ses expériences ne sauraient entraîner la conviction et demandent à être refaites dans d'autres conditions ; pour cela il me faut rappeler brièvement la manière dont il a opéré.

La culture était faite sur une couche mince de sable, arrosée avec la solution minérale suivante :

Phosphate bipotassique	0gr,25
— monopotassique	0gr,25
Sulfate de magnésium	0gr,37
Chlorure de sodium	0gr,2
Phosphate de fer	traces.
Sulfate de calcium	traces.
Eau	1000 grammes.

Chaque fiole contenait en outre 0gr,075 de glucose et, pour amorcer la culture, 2mg,5 d'azote sous forme de nitrate de potassium. Un lent courant d'air, dépouillé d'azote combiné par un barboteur à acide sulfurique, traversait la fiole. Au bout de plusieurs mois, l'azote total de la culture était dosé. Dans le cas où l'algue s'était seule développée en l'absence de tout microbe,

1. Kossowitsch, *Bot. Zeit.*, 1894.

M. Kossowitsch n'a jamais trouvé, à la fin de la culture, plus d'azote qu'il n'en avait mis au début; d'où la conclusion que le cystococcus n'assimile pas d'azote gazeux.

Or, M. Kossowitsch n'a jamais pesé ses récoltes, — la culture sur sable lui rendait la chose presque impossible — mais les rendements que j'ai obtenus dans de nombreuses cultures en milieu liquide glucosé[1] me permettent de supposer très légitimement que dans les conditions où il s'est placé, le poids de la récolte a dû être d'environ la moitié du poids de sucre disparu, soit 40 milligrammes; le cystococcus renfermant 5,14 0/0 de son poids d'azote (nombre obtenu dans un dosage par la méthode de Dumas), 40 milligrammes n'en contiennent pas tout à fait $2^{mgr},5$; le milieu nutritif contenait donc tout l'azote nécessaire à la plante qui pouvait prendre naissance aux dépens du glucose : celle-ci n'avait par suite aucun besoin d'en chercher dans l'atmosphère. Une fois la totalité du sucre consommé, l'algue pouvait, il est vrai, se développer aux dépens de l'anhydride carbonique amené par le courant d'air, — j'ai constaté d'ailleurs combien est laborieuse sa multiplication dans ces conditions; — mais rien ne dit qu'elle puisse satisfaire à la fois au double travail de la synthèse de sa matière hydrocarbonée et de l'organisation de l'azote gazeux; tout ce que l'on sait sur la biologie ds m icrobes fixateurs d'azote, le *Clostridium pasteurianum*, le *Microbe des nodosités des légumineuses*, par exemple, tendrait à faire croire que l'organisation de l'azote libre exige une très grande dépense d'énergie, qui ne peut être fournie que par la destruction d'une grande quantité de matière organique. Il se pourrait donc fort bien que le cystococcus ne soit capable d'assimiler l'azote gazeux que quand la dépense d'énergie pour l'assimilation du carbone est réduite au minimum, c'est-à-dire quand il trouve de la matière organique à brûler comme un microbe.

De plus, M. Kossowitsch, pour amorcer ses cultures, a employé l'azote nitrique; peut-être eût-il mieux fait d'avoir recours à une forme d'azote moins facilement assimilable, comme l'azote organique?

Toutes ces expériences ont donc besoin d'être reprises sur de nouvelles bases.

1. Ces expériences feront l'objet d'un mémoire qui va paraître incessamment sur l'assimilation du carbone par le cystococcus.

M. Bouilhac[1] a recherché si le *Nostoc punctiforme* pouvait prendre de l'azote à l'atmosphère ; de ses expériences il a conclu que le nostoc, cultivé à l'état pur (c'est-à-dire sans autre espèce d'algue mélangée avec lui,) ne fixait pas d'azote libre, tandis qu'il le pouvait en présence de certaines espèces de bactéries. Or, c'est parce qu'il n'a pu obtenir aucun développement de l'algue dans un milieu dépourvu et de toute trace de carbone combiné et de toute trace d'azote combiné, qu'il a cru pouvoir formuler une pareille conclusion. Ce que j'ai dit des expériences de M. Kossowitsch montre qu'il en avait peu le droit.

MM. Dehérain et Demoussy[2] ont observé que des légumineuses peuvent se développer vigoureusement sans porter de nodosités sur leurs racines, mais seulement quand le sol se recouvre d'une couche d'algues vertes. Les microbes des nodosités n'ont évidemment pas fourni d'azote à la plante, mais rien ne dit que ce soit les algues plutôt que des bactéries qui aient pris dans l'atmosphère et mis dans le sol l'azote nécessaire aux légumineuses.

Les travaux qui ont trait à la fixation de l'azote libre par les algues se réduisent à ceux que j'ai indiqués. Un seul comporte une conclusion ferme, c'est celui de M. Kossowitsch, et nous avons vu que ses expériences, pêchant par certains côtés, demandaient à être refaites.

Voici comment j'ai opéré.

J'ai dit que la fixation de l'azote libre par le cystococcus exigeait probablement une très grande dépense d'énergie, que la plante ne peut se procurer que par la destruction d'une quantité considérable de matière organique ; la combustion de cette matière organique ne peut s'effectuer sans la consommation de beaucoup d'oxygène; d'où la nécessité d'aérer les cultures le plus possible et par conséquent d'avoir recours à des milieux nutritifs solides. Une autre raison plaide d'ailleurs dans le même sens; en la circonstance, l'azote ne saurait être, sans un grave inconvénient, mesuré à la plante parcimonieusement; or la très faible solubilité de ce gaz dans l'eau fait qu'en vivant dans un milieu liquide, la plante n'en aurait guère à sa disposition.

Pour aider à la vie des premières cellules, il faut mettre un

1. Bouilhac, *Ann. agron.*, t. XXIV, p. 579.
2. Dehérain et Demoussy, *Ann. agron.*, t. XXVI, p. 169.

peu d'azote dans le milieu de culture. J'ai, dans ce but, fait choix, pour substratum nutritif, de bouillon de haricots glucosé et gélosé, après m'être assuré que la plante s'y développait fort bien; c'est, je le rappelle, le milieu sur lequel M. Mazé[1] a cultivé la bactérie des nodosités des légumineuses. 150 grammes de haricots sont portés à l'ébullition dans un litre d'eau; au liquide filtré j'ajoute 1 0/0 de glucose et 1,5 0/0 de gélose; le mélange chauffé à 120°, puis filtré, est réparti dans les vases de culture et stérilisé à 115°. Ces vases sont des grands matras à fond plat et à tubulure latérale, connus sous le nom de ballons à toxine, dans lesquels on peut faire passer un courant d'air entrant par la tubulure supérieure et sortant par la tubulure latérale; chaque matras contenait 100 c. c. de gélose nutritive, qui, vu la très grande surface du fond, formait une couche extrêmement mince.

L'air, qui arrivait sur la culture, devait évidemment être dépourvu de toute trace d'azote combiné; à cet effet, il traversait un très long tampon de coton pour se débarrasser des parcelles de nitrates solides, qui pouvaient se trouver dans l'air du laboratoire; il passait ensuite dans un barboteur à potasse concentrée qui retenait les vapeurs nitreuses, puis dans un flacon laveur à acide sulfurique, auquel il abandonnait son ammoniaque, enfin, dans un flacon laveur contenant de l'eau, qui le saturait d'humidité; cette eau pouvait en outre retenir les traces de vapeurs nitreuses qui ne se seraient pas combinées à la potasse.

L'expérience étant disposée comme je viens de le dire, les ballons sont ensemencés, puis exposés à la lumière diffuse à une température oscillant entre 12° la nuit et 28° le jour.

La culture se fait bien; au bout de 20 jours on dose l'azote total dans les ballons de culture et dans des ballons témoins, contenant la même quantité de la même gélose, mais n'ayant pas été ensemencés.

Chaque ballon reçoit 25 c. c. d'une solution aqueuse d'acide sulfurique à 5 0/0, puis est chauffé à 120° pendant 1/4 d'heure; la gélose est saccharifiée et les traces d'ammoniaque qu'elle peut contenir se sont combinées à l'acide. Le liquide de chaque ballon est alors soigneusement introduit dans un ballon à atta-

1. MAZÉ, *Ann. Inst. Past.*, 1897, p. 45.

que de Kjeldahl; il y est concentré par distillation à basse température, sous pression réduite, dans un courant d'air sec (la dessiccation de cet air est effectuée par le chlorure de calcium et l'acide sulfurique; le courant d'air ne peut ainsi amener aucune trace d'ammoniaque dans le ballon). La distillation est continuée jusqu'à ce que le contenu du ballon soit devenu absolument pâteux.

Ceci fait, l'azote est dosé par la méthode de Kjeldahl.

Voici les résultats obtenus dans une expérience :

Azote au début de la culture	18mgr,9
— à la fin —	18mgr,6

La différence des 2 nombres est de l'ordre des erreurs d'expérience, on peut donc affirmer que le développement de la plante n'a amené aucun changement dans la teneur en azote du milieu.

Cependant pour que la plante ait à coup sûr un excès de glucose à sa disposition, l'expérience a été recommencée, chaque ballon contenant alors 2 fois plus de sucre, soit 2 0/0; le résultat a été le suivant :

Azote au début de la culture	20mgr,2
— à la fin —	20mgr,0

Il n'y a donc pas eu fixation d'azote libre pendant la durée de la culture.

Le cystococcus est incapable, même dans les conditions les plus favorables, de prendre une partie de son azote dans l'atmosphère.

II

ASSIMILATION DE L'AZOTE NITRIQUE

Je serai bref sur l'assimilation des nitrates par le cystococcus, parce que son étude ne permet de résoudre aucune question d'ordre général.

Depuis les travaux de Boussingault[1] et de Georges Ville[2], on sait combien l'azote nitrique est facilement assimilé par les végétaux à chlorophylle et combien il aide à leur développe-

1. Boussingault, *Ann. de Chim. et de Phys.*, 3e série, t. XLVI, p. 5.
2. Georges Ville, *Ann. de Chim. et de Phys.*, 3e série, t. XLVI, p. 214.

ment; malheureusement, on ne sait presque rien sur le mécanisme de cette assimilation. Le seul fait qui semble établi d'une manière à peu près indiscutable, par les travaux de Schlœsing[1], Laurent, Marchal et Carpiaux[2], c'est que les nitrates peuvent, dans les tissus végétaux, être réduits en ammoniaque; je dis « peuvent être réduits », parce que rien ne prouve que la totalité de l'azote nitrique doive subir cette transformation pour être assimilée.

La lumière paraît jouer un rôle important dans cette réduction, ainsi que le fit remarquer le premier M. Pagnoul[3]; mais tandis que les uns, comme MM. Laurent, Marchal et Carpiaux, admettent que cette réaction puisse se faire à l'obscurité, en niant toutefois avec Godlewsky[4] que dans ces conditions l'ammoniaque puisse s'organiser, les autres, comme Mazé[5], regardent les deux choses comme également possibles.

Le cystococcus peut prendre son azote aux nitrates.

Voici qui le prouve : Faisons la solution nutritive suivante :

Sulfate de magnésium..................	1 gramme.
Phosphate bipotassique................	2 grammes.
Nitrate de potassium..................	2 —
Nitrate de calcium....................	$0^{gr},05$
Sulfate ferreux.......................	traces
Glucose...............................	10 grammes.
Eau...................................	1000 —

Après chauffage à 120°, filtration et stérilisation à 120°, ensemençons-la; après 13 jours de séjour à l'étuve, nous pourrons recueillir 396 milligrammes de plante sèche, renfermant $20^{mgr},3$ d'azote, qui ne peuvent provenir que des nitrates introduits dans le milieu.

Si les nitrates sont réduits par l'algue, ils peuvent l'être, soit à l'intérieur des cellules, soit à l'extérieur; il n'y a aucun moyen de s'en assurer dans le premier cas; dans le second, au contraire, on peut le faire en cherchant l'ammoniaque dans le liquide de culture. C'est ce que j'ai fait.

Cette ammoniaque n'est certainement pas à l'état de liberté; un liquide maintenu à l'air libre en couche mince ne saurait

1. Schlœsing, *C. R.*, t. CXXXI, p. 716.
2. Laurent, Marchal et Carpiaux, *Bull. de l'Acad. roy. des Sc. de Belg.*, 3e série, 1896, t. XXXII, p. 815.
3. Pagnoul, *Ann. agron.* 1879, t. V, p. 486.
4. Godlewsky, *Auzeig. der Akadd. Wiss. in Krakau*, 1897, mars.
5. Mazé. *C.R.*, t. CXXVIII, p. 185.

pendant longtemps conserver de l'ammoniaque non combinée[1]; si elle existe, elle a dû entrer en combinaison avec les acides du milieu. Pour la caractériser avec certitude, il faut la déplacer par une base, puis la distiller; or, si l'on chauffe avec une base un liquide contenant de la matière organique, ce qui est précisément le cas actuel, celle-ci est attaquée, et de l'ammoniaque se dégage, alors que le liquide primitif n'en renfermait pas trace. Avec la magnésie calcinée, préconisée par Boussingault, l'attaque est faible, mais elle existe, je l'ai constatée moi-même, après bien d'autres; point n'est besoin de chauffer à 100° pour obtenir ce résultat, une température de 50° suffit. A la température ordinaire seulement, cette attaque ne se produit pas, tout au moins rapidement.

Aussi ai-je opéré à froid. La méthode que j'ai employée consiste à faire, avec la trompe à eau, le vide dans le ballon qui contient le liquide de culture additionné de magnésie; au sortir du ballon et avant de se rendre à la trompe, les gaz extraits, parmi lesquels se trouve l'ammoniaque mise en liberté, traversent un barboteur contenant le réactif de Nessler.

Je me suis assuré, par des essais préliminaires, que cette méthode est très sensible, elle permet de reconnaître la présence dans le ballon de simples traces d'un sel ammoniacal, et comme dans ces conditions la magnésie ne saurait attaquer la matière organique, elle offre une grande sécurité.

En appliquant ce procédé de recherche à l'étude du liquide de culture, j'ai reconnu que le Nessler se trouble très légèrement en prenant une teinte jaune extrêmement pâle, comme si le liquide contenait une trace d'un sel ammoniacal.

Je crois donc que le cystococcus est capable de réduire les nitrates; je ne puis être plus affirmatif, ne pouvant baser mon opinion que sur une réaction, qui n'est pas très nette.

D'ailleurs, l'ammoniaque, je vais le montrer, est un excellent aliment pour la plante; elle doit donc être consommée aussitôt produite, et son absence du liquide de culture ne prouve pas que les nitrates sont assimilés sans être réduits.

La lumière n'est évidemment pas nécessaire pour que l'azote nitrique soit assimilé, les récoltes abondantes que j'ai obte-

1. On sait que M. Schlœsing a fondé sur ce fait une méthode de dosage de l'ammoniaque en présence des matières organiques azotées.

nues à l'obscurité en sont témoins; mais ignorant si la totalité des nitrates doit être réduite pour être utilisée, je ne puis dire si cette réduction est possible ou non à l'obscurité.

L'étude du rôle de la lumière dans l'assimilation de l'ammoniaque trouvera sa place tout naturelle dans le chapitre suivant.

III

ASSIMILATION DE L'AZOTE AMMONIACAL

L'azote ammoniacal est certainement consommé par les végétaux ; la pratique agricole le donnait à penser depuis longtemps : les travaux de Müntz[1], de Mazé[2] l'ont prouvé d'une manière incontestable.

L'action sur les plantes des sels ammoniacaux n'est cependant pas comparable à celle des nitrates, car ceux-là peuvent devenir toxiques dans certains cas.

Depuis longtemps Bouchardat[3], Cloëz avaient signalé le fait; tout récemment Mazé[4] a fait voir que, s'il était possible de faire pousser du maïs dans une solution minérale contenant 2 0/00 de nitrate de sodium, on ne pouvait, sans préjudice pour la plante, remplacer le nitrate par un même poids de sulfate d'ammonium; aux doses inférieures à 0,5 0/00, le sel ammoniacal est aussi bon aliment que le nitrate, mais aux doses supérieures il est toxique.

Sur la première transformation que subit l'ammoniaque pour être assimilée, les opinions diffèrent. Les uns, avec Molisch, Kreusler, Laurent[5], pensent qu'elle est assimilée directement sans être oxydée dans aucun cas; les autres, comme Berthelot et André, Heckel[6], Lundstrœm[7], soutiennent que les nitrates peuvent prendre naissance dans les tissus végétaux.

Relativement au rôle de la lumière dans l'assimilation des sels ammoniacaux, les avis sont encore partagés.

Pour MM. Pagnoul[8], Müntz[9], Kinoshita[10], les plantes peuvent

1. Muntz, *C. R.*, CIX.
2. Mazé, *Ann. Inst. Past.*, janv. 1900.
3. Bouchardat, *C. R.*, 1843, XVI.
4. Mazé, *loc. cit.*
5. Laurent, *Ann. Inst. Past.*, 1889, III.
6. Heckel, *C. R.*, 1890, CX.
7. Berthelot et André, *Ann. de Chim. et de Phys.*, 1886, VIII.
8. Pagnoul, *loc. cit.*
9. Muntz, *loc. cit.*
10. Kinoshita, *Centralb. fur agrik. Chem.*, 1896, p. 362.

faire à l'obscurité la synthèse de leurs matières protéiques aux dépens de l'ammoniaque; la lumière y aiderait beaucoup, mais son absence ne l'empêcherait pas absolument. Tout au contraire, MM. Laurent, Marchal et Carpiaux, Godlewsky se refusent à admettre l'assimilation de l'azote ammoniacal à l'obscurité.

J'ai dû me demander quelles réponses permettait de faire à ces diverses questions l'étude du cystococcus humicola.

Le milieu de culture que j'ai toujours employé a été, pour la circonstance, légèrement modifié, le nitrate devant être remplacé par un sel ammoniacal; il avait la composition suivante :

Sulfate de magnésium	1 gramme.
Phosphate bipotassique	2 grammes.
Chlorure de calcium	0gr,023
Sulfate d'ammonium	0gr,5
Sulfate ferreux	traces.
Glucose	10 grammes.
Eau	1000 grammes.

Les cultures sont faites dans les fioles plates, dites boîtes à culture de M. Roux, contenant chacune 100 c. c. de liquide nutritif; j'ai également cultivé la plante dans un liquide renfermant deux fois plus d'ammoniaque, soit 1 0/00 de sulfate d'ammonium au lieu de 0,5 0/00.

Les cultures, dans ces milieux, débutent un peu plus tôt que dans ceux qui sont nitratés : elles ont au moins 24 heures d'avance, — ce qui s'explique bien en supposant que les nitrates doivent être réduits pour être assimilés. Huit jours après l'ensemencement, les récoltes sont très développées, très vertes, aussi abondantes dans les milieux plus riches en ammoniaque que dans ceux qui le sont moins.

Au bout de 13 jours de culture, dans le liquide renfermant 0,5 0/00 de sulfate d'ammonium, la plante est encore très verte; ses cellules ne contiennent aucun grain d'amidon; le poids de la récolte, qui est de 95 milligrammes, témoigne que l'*azote de l'ammoniaque a été assimilé*.

Mais la récolte est bien faible, eu égard à ce qu'elle eût été en présence du nitrate de potassium.

L'examen de la marche d'une culture peut nous en donner la raison. J'ai étudié une récolte vieille de 13 jours, je vais en examiner une vieille de 19; la comparaison des deux nous éclaircira.

La plante, qui, après 13 jours de développement, était très verte, se met à jaunir ensuite; en sorte que, 6 jours plus tard, elle a pris une couleur vert jaune qui dénote un état pathologique; ses cellules sont devenues grosses, leur paroi est mince, elles sont un peu jaunes (à l'examen microscopique), quelques-unes complètement incolores; aucune ne renferme d'amidon. Le poids de la récolte s'élève à 96 milligrammes, il est resté identique à ce qu'il était 6 jours auparavant.

A partir du 13e jour, le cystococcus ne s'est donc plus développé; il est même probable que cet arrêt de la culture datait déjà d'un ou de plusieurs jours au moment où je l'ai constaté. La plante se serait rapidement multipliée jusqu'à ce que le poids de la récolte atteigne 95 milligrammes, après quoi la division cellulaire se serait arrêtée.

A quelle cause rattacher cette anomalie? La plante ne manque pas de sucre; le 13e jour il en reste encore 832 milligrammes dans son milieu de culture; elle ne manque pas d'azote non plus; dans les milieux renfermant 1 0/00 de sulfate d'ammonium, au lieu de 0,5 0/00, elle se comporte de même; enfin l'ammoniaque n'a exercé aucune action antiseptique, puisqu'elle est consommée très rapidement au début, alors qu'elle est en plus grande quantité dans le liquide. En somme, tout se passe comme si, en prenant son azote au sulfate d'ammonium, la plante fabriquait un produit toxique, qui empêche son développement ultérieur.

Nous avons vu, en étudiant l'assimilation de l'azote nitrique, qu'il est possible que les nitrates soient réduits dans les cellules. Ce que nous venons de voir de l'assimilation de l'azote ammoniacal prouve que cette réduction ne saurait porter sur la totalité des nitrates, toute l'ammoniaque ainsi produite ne pouvant être utilisée.

L'ammoniaque est absorbée en nature, sans être oxydée auparavant, le liquide de culture ne donnant pas la moindre coloration bleue avec le sulfate de diphénylamine. Si donc, avant d'être assimilée, l'ammoniaque doit être oxydée, elle ne peut l'être qu'à l'intérieur des cellules; or, j'ai épuisé la plante par l'eau bouillante et reconnu que ce liquide filtré prend, avec le sulfate de diphénylamine, une coloration bleue très faible, mais très nette.

Il est par suite très probable que les cellules contiennent des nitrates; il y a probabilité et non certitude, car, on le sait, d'autres oxydants que l'acide nitrique, tels les nitrites, peuvent donner une coloration bleue avec la diphénylamine; je puis ajouter, d'ailleurs, que dans le cas actuel la coloration bleue ne serait pas due aux nitrites; le liquide d'épuisement, ne donnant aucune coloration avec le réactif de Griess (acide sulfanilique et naphtylamine), n'en renferme pas.

Il me semble très vraisemblable que l'algue oxyde, avant de l'assimiler, une partie au moins de l'ammoniaque qu'elle a absorbée.

Peu importerait donc que l'on offre à la plante de l'azote soit nitrique, soit ammoniacal, celle-ci s'arrangeant toujours pour en avoir à sa disposition sous les deux formes.

Quelle est l'influence de la lumière sur l'assimilation de l'ammoniaque? J'ai fait 2 séries de cultures ayant duré les unes 13 jours et les autres 19, pour être renseigné : les poids des récoltes sont indiqués dans le tableau suivant.

MODE D'ÉCLAIREMENT	POIDS DES RÉCOLTES EN MILLIGR.	
	au bout de 13 jours.	au bout de 19 jours.
A la lumière	95	96
A l'obscurité	57	87

La culture se fait un peu plus lentement à l'obscurité qu'à la lumière, mais elle se fait incontestablement : les cellules, dévoloppées à l'obscurité, sont très riches en amidon, celles qui ont vu la lumière ne le sont pas : les chiffres de la seconde ligne sont donc en réalité un peu trop forts puisque l'amidon, substance non organisée, a été pesé en même temps que le protoplasma, mais ils indiquent le sens du phénomène : c'est tout ce qu'on leur demande.

La lumière n'est pas indispensable pour que l'azote ammoniacal soit assimilé, l'expérience ne me permet pas de dire plus.

IV

ASSIMILATION DE L'AZOTE ORGANIQUE

Il est dans le sol de grandes quantités d'azote organique, que les infiniment petits transforment en azote ammoniacal d'abord, en azote nitrique ensuite. Les plantes supérieures doivent-elles attendre la destruction de la matière organique pour s'emparer de son azote, ou peuvent-elles l'assimiler alors qu'il est encore en combinaison avec le carbone?

La question est assez intéressante pour mériter une étude approfondie, qui du reste est encore à faire; jusqu'ici elle n'a même pas été abordée pour ainsi dire. Ce sujet, sortant du cadre que je m'étais tracé, n'a été l'objet de ma part que de fort peu d'expériences, dont je vais donner les résultats.

Je me suis seulement demandé si la plante pouvait assimiler l'azote de l'asparagine, que l'on rencontre très souvent dans les végétaux, et celui de la peptone, et quel rôle la lumière peut jouer dans cette assimilation.

Les milieux de cultures employés ont été les suivants :

Sulfate de magnésium	1 gr.	Sulfate de magnésium	1 gr.
Phosphate bipotassique	2 gr.	Phosphate bipotassique	2 gr.
Asparagine	1gr,8	Peptone Witte	1gr,8
Chlorure de calcium	0gr,1	Chlorure de calcium	0gr,1
Sulfate ferreux	0gr,05	Sulfate ferreux	0gr,05
Glucose	10 gr.	Glucose	10 gr.
Eau	1000 gr.	Eau	1000 gr.

L'asparagine et la peptone ont été dissoutes à part, et leurs solutions stérilisées par filtration ; celles-ci ont été ajoutées aux solutions minérales sucrées stérilisées à part à l'autoclave.

Pour pouvoir comparer les cultures faites dans ces milieux avec celles qui eussent poussé, dans les mêmes conditions, sur un milieu nitraté, j'ai en même temps cultivé la plante dans le liquide suivant :

Sulfate de magnésium	1 gr.
Phosphate bipotassique	2 gr.
Nitrate de calcium	1 gr.
Sulfate ferreux	0gr,05
Glucose	10 gr.
Eau	1000 gr.

Une partie des cultures était maintenue à l'obscurité, l'autre exposée à la lumière; les poids des récoltes obtenues en 14 jours sont indiqués dans le tableau suivant :

SOURCE D'AZOTE	POIDS DES RÉCOLTES EN MILLIGR.	
	à la lumière.	à l'obscurité.
Asparagine	150	37
Peptone	127	48
Nitrate de calcium	578	19

Le cystococcus peut prendre de l'azote à l'asparagine et à la peptone, mais aucune de ces deux substances n'est une source d'azote comparable au nitrate de calcium : elles lui sont inférieures.

L'azote de l'asparagine et de la peptone est certainement assimilé à l'obscurité.

Dans les 6 cultures ci-dessus la plante était très verte, sauf dans celle faite à la lumière et en présence de peptone, où elle avait une couleur jaune très prononcée.

En somme, le cystococcus peut, même à l'obscurité, assimiler l'azote des matières organiques.

CONCLUSIONS

L'algue ne prend pas d'azote à l'atmosphère.

Elle assimile très facilement les nitrates à la lumière comme à l'obscurité, en en réduisant peut-être une partie à l'état d'ammoniaque.

Elle consomme également l'azote ammoniacal, probablement en l'oxydant partiellement. La lumière n'est pas indispensable pour cela.

Elle peut prendre de l'azote à des matières organiques, l'asparagine et la peptone, par exemple.

Recherches sur l'absorption de la toxine tétanique

Par MM. V. MORAX et A. MARIE,

(DEUXIÈME MÉMOIRE[1])

(Travail du laboratoire de M. Roux.)

Nous avons montré, dans un précédent mémoire, que la tétanine, absorbée à la périphérie des nerfs rachidiens, se déplace continuellement vers leur centre cellulaire, en réalisant ainsi un véritable courant cellulipète.

Les résultats expérimentaux nous ont fait admettre que ce courant se produisait dans la substance nerveuse cylindraxile. Il importait de savoir si les différentes variétés de fibres nerveuses présentaient, à l'égard de la tétanine, les mêmes propriétés. On sait, en effet, que les nerfs rachidiens, le sciatique par exemple, sur lequel portent la plupart de nos expériences, sont constitués par la réunion de trois types de fibres nerveuses: des fibres motrices, des fibres vaso-motrices et des fibres sensitives. L'absorption de la tétanine se fait-elle indifféremment par ces trois types de fibres, ou bien existe-t-il une affinité spéciale de la toxine tétanique pour le neurone moteur périphérique? Voilà la question à laquelle nous avons cherché à répondre par l'expérience.

On sait qu'à l'inverse des nerfs rachidiens, certains nerfs craniens ne contiennent qu'une des variétés de filets nerveux. Tout au moins la prédominance d'une des variétés de fibres est telle, qu'on peut considérer comme purement sensitif l'ophtalmique de Willis (branche supérieure du trijumeau), comme purement moteur le massétérin (branche motrice du trijumeau), comme purement vaso-moteur le sympathique cervical. Il paraissait donc indiqué de répéter l'expérience de Meyer dans le territoire innervé par ces nerfs; toutefois, le trajet compliqué de ces troncs nerveux et leur brièveté chez le cobaye ne permettaient pas d'utiliser cet animal. Nous avons été forcés d'expérimenter sur

1. A. Marie et V. Morax. Recherches sur l'absorption de la toxine tétanique. Ces *Annales*. nov. 1902. p. 818.

le chien, en ce qui concerne l'absorption de la tétanine par les fibres sensitives du nerf ophtalmique de Willis.

Exp. I.— Un chien de 1.850 grammes reçoit, le 19 avril 1902, dans le tissu cellulaire sous-cutané de la région frontale gauche, une solution de 0 gr. 01 de tétanine dans un c. c. d'eau. Le 20 avril, aucun symptôme. Le 21 avril, l'animal est en plein tétanos : il a de la peine à se tenir sur ses pattes et n'y parvient qu'en les maintenant écartées. La tête est déviée du côté droit; la paupière droite est fermée. On tue l'animal par asphyxie, puis on dissèque le nerf ophtalmique de Willis dans son trajet orbitaire, d'autant plus facile à suivre qu'il chemine immédiatement au-dessous du périoste orbitaire. Ce nerf est inséré sous la peau d'une souris qui présente, après 24 heures, un tétanos local manifeste.

Il ressort de cette expérience que les fibres sensitives dont est constitué le nerf ophtalmique de Willis ont absorbé la tétanine; on peut objecter, il est vrai, que l'ophtalmique de Willis renferme quelques fibres vaso-motrices et qu'on ne saurait, par conséquent, conclure en toute certitude à l'affinité de la tétanine pour les fibres sensitives. Quoi qu'il en soit, cette première expérience nous semblait de nature à ébranler l'opinion qui paraissait la plus vraisemblable, et d'après laquelle le neurone périphérique moteur devait seul absorber la tétanine.

Pour aborder le problème par une autre de ses faces, nous résolûmes de modifier notre mode expérimental en recherchant à la fois, quantitativemement et qualitativement, la tétanine dans les différents nerfs rachidiens, dans les racines, dans les nerfs craniens ou sympathiques.

Après injection, en un point donné d'une région musculaire, d'une dose plusieurs fois mortelle de tétanine, nous attendions la mort de l'animal pour rechercher la teneur en tétanine des humeurs, et d'un poids égal des différents nerfs ou racines, rachidiens et craniens, ainsi que du tissu nerveux central.

L'expérience a porté tout d'abord sur une ponette, que M. le P[r] Nocard a bien voulu mettre à notre disposition, ce dont nous lui sommes vivement reconnaissants.

Exp. II.— Une ponette de 334 kilogrammes reçoit, le 23 janvier 1903, 3 gr. de toxine tétanique dissoute dans 20 c. c. d'eau; l'injection est poussée dans le gastrocnémien de la jambe postérieure gauche. Le 24 janvier 1903, au matin, on constate déjà de la contracture locale ; le trismus et un tétanos généralisé lui succèdent rapidement. La mort survient dans la nuit du 24 au 25 janvier, un peu moins de 3 jours après l'inoculation.

L'autopsie ne put être pratiquée que le surlendemain 27 janvier, mais le froid rigoureux qui régnait alors rendait ce retard de peu d'importance.

Grâce à M. le Pr Petit, de l'École d'Alfort, qui a bien voulu opérer l'autopsie du cheval, nous avons pu prélever un très grand nombre de nerfs rachidiens ou craniens, ainsi que les centres médullaires et encéphaliques. Les nerfs étaient répartis dans des tubes stériles et étiquetés.

Pour la moelle, nous avons pu isoler d'emblée les racines postérieures entre le ganglion et la pénétration dans la corne postérieure, les racines antérieures, les cordons blancs (faisceaux postérieurs, latéraux, antérieurs) dans la région lombaire et la région dorsale. Nous avons prélevé les faisceaux pyramidaux au niveau du bulbe, de la protubérance, des pédoncules et de la capsule interne.

De chacun de ces nerfs ou de ces cordons blancs de la moelle, nous avons pesé 0 décigr. 1. Cette petite masse était divisée en deux moitiés, et chacune de ces parts, soit environ 0 centigr. 05, était insérée sous la peau d'une souris. On eut soin d'inoculer deux souris de poids différent : l'une, petite, de 10 grammes en moyenne, et l'autre plus forte, et pesant entre 15 et 20 gr.

Les nerfs étaient dépouillés de la graisse qui les entoure et séchés rapidement entre deux feuilles de papier-filtre stérilisé, avant d'être pesés.

Nous avons montré, dans notre précédent mémoire, qu'il suffisait d'une macération d'assez courte durée dans l'eau physiologique pour que le nerf se dépouillât de la totalité de sa toxine.

Aussi, pour contrôler les résultats obtenus par l'inoculation directe du tissu nerveux sous la peau de la souris, nous avons mis à macérer un poids donné des différents nerfs dans un c. c. d'eau physiologique, dont nous avons inoculé une dose correspondant à la macération de 0 gr. 1 de tissu nerveux ou musculaire.

Les expériences de cette série permettront de comparer les tissus musculaires et nerveux au point de vue de leur teneur en toxine. Nous avions inséré du tissu musculaire de la région crurale des pattes postérieures gauche et droite à quatre souris, qui sont mortes d'infection au 3e jour sans avoir présenté de signes de tétanos. L'expérience de la macération montre que la quantité de tétanine contenue dans un poids correspondant de tissu musculaire est très inférieure à celle que renferment les nerfs sciatiques ou les nerfs craniens.

La toxine que nous avons utilisée pour toutes ces expériences a été préparée par précipitation au sulfate d'ammoniaque d'une culture tétanique abondante faite en symbiose avec le subtilis. La dose mortelle pour la souris de 15 grammes est de 0 gr. 0000005. En supposant une diffusion égale de la toxine injectée dans l'organisme du cheval, 0 gr. 05. de chacun de ses tissus devrait contenir une dose mortelle pour la souris.

Un simple examen du résultat [1] des inoculations montre qu'il y a à ce point

1. Nous rappelons la signification des signes conventionnels utilisés dans nos tableaux pour indiquer les troubles présentés par les animaux en expérience :

O	signifie	pas de symptômes tétaniques.
—	«	tétanos local léger.
=	«	tétanos local très accusé.
≡	«	tétanos généralisé.
+	«	mort.

	TISSUS INOCULÉS	POIDS	ANIMAL	POIDS	28	29	30	31	1	2	3	4	5	6	7	11
Humeurs	Sang	0.1	Souris.	11 gr.	=	≡	+									
	Sang	0.5	»	15 gr.	≡	+										
	Liq. céphal. rachidien	0.1	»	12 gr.	O	=	=	≡	≡	≡	+					
	Humeur aqueuse	0.1	»	12 gr.	O	O	—	—	=	=	=	=	=	=	=	=
Nerfs rachidiens	Sciatique gauche	0.05	»	10 gr.	≡	+										
	» »	0.05	»	16 gr.	O	=	≡	+								
	Sciatique droit	0.05	»	12 gr.	O	O	=	=	≡	≡	≡	≡	≡	+		
	Nerf cubital	0 05	»	10 gr	O	O	—	—	≡	≡	≡	=	=	=	=	=
	» »	0.05	»	20 gr.	O	O	O	O	—	=	=	=	=	=	=	=
Nerfs craniens	Sympathique cervical	0.05	»	11 gr.	O	=	+									
	» »	0.05	»	18 gr.	O	—	≡	+								
	Nerf massétérin	0 05	»	7 gr.	O	=	≡	+								
	» »	0.05	»	16 gr.	O	O	=	≡	+							
	Nerf ophtalm. de Willis	0 05	»	12 gr.	O	—	=	=	+							
	» » »	0.05	»	16 gr.	O	O	=	≡	≡	+						
	Pneumo-gastrique	0.05	»	9 gr.	O	—	=	≡	+							
	» »	0.05	»	18 gr.	O	—	=	≡	≡	≡	+					
	Lingual	0.05	»	10 gr	O	—	=	≡	≡	≡	+					
	»	0.05	»	18 gr.	O	—	=	=	≡	≡	≡	≡	≡	+		
Rac. rachidiennes lombaires	Rac. antér. g. lombaire	0.05	»	8 gr.	O	—	=	=	+							
	» »	0.05	»	18 gr.	O	O	—	=	≡	≡	≡	+				
	Rac. antér. dr. lombaire	0.05	»	10 gr.	O	—	=	≡	+							
	» »	0.05	»	17 gr.	O	—	=	=	≡	≡	≡	≡	≡	=	=	=
	Rac. postér. g. lombaire	0.05	»	9 gr.	O	—	=	≡	≡	≡	≡	≡	+			
	» »	0.05	»	11 gr.	O	—	=	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	+	
	Rac. postér. dr. lombaire	0 05	»	8 gr.	O	—	=	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	+
	» »	0.05	»	12 gr.	O	—	=	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡
Cord. medull. lomb.	Faisc. pyramidal gauche	0.1	»	18 gr	O	—	=	+								
	Faisc. pyramidal droit	0.1	»	24 gr.	O	O	—	—	=	=	=	=	=	=	=	=
	Faisc. postér. gauche	0.1	»	24 gr.	O	O	—	=	=	=	=	=	=	=	=	=
	Faisc. antér. gauche	0.1	»	20 gr.	O	—	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
	Faisc. antér. droit	0.1	»	21 gr.	O	—	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
Rég. dorsale	Faisc. pyramidal gauche	0.05	»	10 gr.	Pas de tétanos											
	Faisc. pyramidal droit	0.05	»	8 gr.	»											
	Faisc. postér. droit	0.05	»	9 gr.	O	O	O	O	O	—	—	—	=	=	=	=
	Faisc. postér. gauche	0.05	»	8 gr	Pas de tétanos											
Bulbe	Faisc. postér. droit	0.05	»	11 gr.	Pas de tétanos											
	Faisc. postér. gauche	0.1	»	17 gr.												
	Pyramides antér. gauche	0 05	»	15 gr.												
	Pyramides antér. droit	0.05	»	21 gr.												
Pédoncules	Pédoncule dr. zone interne	0.1	»	17 gr	Pas de tétanos											
	Pédoncule dr. zone externe	0.1	»	17 gr.	O	O	O	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Pédoncule g. zone interne	0.1	»	14 gr.	Pas de tétanos											
	Pédoncule g. zone externe	0.1	»	15 gr.	»											
Cerveau	Capsule interne droite	0.1	»	13 gr.	Pas de tétanos											
	» »	0.1	»	12 gr.												
	Nerf optique	0.7	»	14 gr.												

de vue des différences considérables, déjà très manifestes. en ce qui concerne les humeurs (sang, liquide céphalo-rachidien, humeur aqueuse).

TISSUS MACÉRÉS	POIDS	ANIMAL	POIDS	29	30	31	1	2	3	4	5	6	11
Sciatique gauche	0.1	Souris...	11 gr.	=	+								
Sympathique	0.1	»	15 gr.	—	≡	+							
Zygomatique	0.1	»	16 gr.	O	O	=	≡	+					
Massétérin	0.1	»	15 gr.	O	=	=	=	=	+				
Lingual	0.1	»	15 gr.	—	—	≡	≡	+					
Muscle crural gauche	0.1	»	15 gr.	—	=	=	=	≡	≡	≡	≡	≡	+
Sciatique droit	0.1	»	20 gr.	O	=	=	=	=	=	=	=	=	=
Cubital droit	0.1	»	17 gr.	O	=	=	=	=	=	=	=	=	=
Nerf optique	0.1	»	19 gr.	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O

Analysons les résultats obtenus.

Nous voyons tout d'abord que le nerf dont les fibres innervent la région inoculée se charge tout particulièrement de toxine : 0 gr. 05. du sciatique gauche a tué la souris en deux jours, alors qu'un poids double de sang, (0 c. c. 1), n'a déterminé la mort qu'en trois jours. Le sciatique du côté opposé à l'injection, les nerfs rachidiens éloignés du point d'injection, renferment, à dose relativement petite, de la tétanine. La faible intensité de cette absorption apparaît nettement si on compare les souris inoculées avec les nerfs rachidiens avec celles qui ont reçu les nerfs sympathiques et les nerfs craniens.

La proportion considérable de toxine contenue dans le sympathique cervical est un fait des plus intéressants, et qui nous paraît démontrer à l'évidence la part très marquée que prennent les neurones sympathiques à l'absorption de la tétanine. On peut supposer que cette absorption se fait tout particulièrement au niveau des parois musculaires par les fibres vaso-motrices, puisque le sang est toujours abondamment chargé de toxine.

On est frappé aussi de la proportion de toxine contenue dans le nerf massétérin, nerf exclusivement moteur, rameau de la 5e paire crânienne, et qui innerve les muscles masticateurs. Ce pouvoir d'absorption du massétérin nous fait comprendre comment il peut se faire qu'un des symptômes les plus précoces du tétanos chez le cheval consiste précisément dans le trismus. On s'explique aisément qu'en puisant la tétanine dans le

sang, les fibres nerveuses, dont le pouvoir d'absorption est le plus intense, manifesteront les premières les symptômes qui attestent la souffrance des centres nerveux auxquels ces fibres correspondent.

Le nerf ophtalmique de Willis, nerf presque exclusivement sensitif, renferme à peu près autant de toxine que le nerf massétérin. Il en est de même du pneumogastrique et du lingual.

En ce qui concerne le pouvoir absorbant des neurones sensitifs et moteurs, l'inoculation des racines rachidiennes lombaires, antérieures et postérieures, nous fournit des indications intéressantes. Les racines postérieures droites et gauches renferment un peu moins de toxine que les racines antérieures, mais la différence n'est pas considérable et elle ne nous paraît pas de nature à faire supposer, entre ces deux ordres de fibres, des propriétés d'absorption distinctes.

De l'ensemble de l'expérience II, il nous semble se dégager très nettement cette notion inattendue *que les trois types de neurones périphériques, le moteur, le sensitif et le sympathique, sont également aptes à absorber la toxine tétanique.*

Les autres résultats obtenus par l'inoculation du système nerveux central sont moins intéressants pour la question envisagée dans ce mémoire, néanmoins nous pouvons nous y arrêter un instant.

D'une manière générale, il ressort de cette expérience, qu'alors même qu'on inocule à la souris seulement le faisceau des fibres nerveuses, à l'exclusion de toute cellule des cornes antérieures ou postérieures (chez le cheval, la dissection des faisceaux blancs de la moelle est des plus faciles), on ne parvient pas à déceler la présence de la toxine tétanique dans le neurone cérébral. La très petite quantité de tétanine, trouvée dans les faisceaux blancs de la moelle de la région lombaire, provient, selon toute vraisemblance, de ce qu'à ce niveau il y avait mélange des fibres nerveuses du neurone périphérique, fortement chargées de toxine (neurones moteurs et sensitifs du sciatique), avec les faisceaux pyramidaux (prolongement cylindraxile des neurones cérébraux). On sait, en effet, que les prolongements cylindraxiles des neurones moteurs, qui vont constituer les nerfs rachidiens, ne quittent pas immédiatement la moelle après leur naissance des cellules des cornes antérieures, mais qu'ils

accomplissent un court trajet vertical avant de sortir de la moelle, au-dessus ou au-dessous de leur point d'origine.

Cette disposition fait qu'en prélevant des cordons blancs de la moelle au niveau de la région lombaire, on obtient forcément un mélange de fibres chargées de toxine et de fibres faisant partie des neurones cérébraux. Lorsqu'on prélève hors de la région lombaire le faisceau pyramidal, on constate que son inoculation est absolument inoffensive pour la souris. Il en est de même des autres cordons médullaires, et les deux exceptions (faisceau postérieur droit de la région dorsale, et zone externe du pédoncule droit) nous paraissent s'expliquer par une petite hémorragie ayant mêlé un peu de toxine aux fibres nerveuses.

Il semble donc ressortir de l'inoculation des centres cérébro-médullaires (cordons blancs) que le cylindraxe du neurone cérébral ne renferme pas de tétanine libre. L'absence complète de tétanine décelable dans le nerf optique est une confirmation des plus nettes de cette déduction. On sait en effet que le nerf optique n'est pas, en réalité, un nerf, mais un prolongement du cerveau. Les cylindraxes qui le constituent ne sont pas, à l'égard des autres nerfs craniens, des cylindraxes sensitifs ou moteurs des neurones périphériques, mais représentent des neurones cérébraux. Dans l'espèce, le neurone périphérique est tout entier contenu dans la rétine, entre l'élément percepteur (cône et bâtonnet) et les ramifications de la cellule ganglionnaire, cellule visuelle, dont le cylindraxe formera le nerf optique. Nous reviendrons sur l'interprétation de ces résultats, et nous ne nous y arrêtons que pour expliquer la différence existant entre les nerfs craniens et le nerf optique.

A l'appui de nos déductions basées sur l'expérience II, nous pouvons citer encore une autre expérience faite sur le singe.

Exp. III. — Un singe cercopithèque, du poids de 2 kil. 250, reçoit, le 21 février 1903, 0 gr. 005 de toxine tétanique dans les muscles gastrocnémiens de la patte postérieure droite. Il succombe au bout de 48 heures.

A l'autopsie, faite le lendemain, on prélève des nerfs rachidiens et craniens pour les inoculer, à dose déterminée, à des souris. Voir le tableau, p. 342.

Ici encore, la propriété d'absorption des fibres sympathiques apparaît d'autant plus nettement, que le poids du nerf sympathique cervical, avec son ganglion, ne réalisait que le 1/3 de la quantité de nerf sciatique ou de sang inoculée.

TISSUS INOCULÉS	POIDS	ANIMAUX	POIDS	24	25	26	27	28	1	2	3	4	5	OBSERVATIONS
Sang	0.1	Souris	25	–	=	≡	≡	+						
Sciatique droit....	0.1	»	20	O	O	O	O	–	–	–	=	+		
» »	0.1	»	15	O	O	O	–	–	=	=	+			
Sciatique gauche......	0 1	»	12	O	–	–	–	–	+					Morte d'infection.
Brachial droit......	0.1	»	14	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	
» gauche............	0.1	»	19	–	=	=	=	=	=	=	=	=	–	
Sympathique cervical.......	0.03	»	14	–	–	–	=	≡	≡	≡	≡	≡	≡	
Pneumo-gastrique..........	0.05	»	11	O	O	O	–	–	–	–	=	=	=	
Rac. rachid. lomb. post. dr.	0.1	»	11	–	–	=	≡	≡	+					
» » » g..	0.1	»	13	–	–	+								Morte d'infection.
Rac. rachid. lomb. antér. droite et gauche..........	0.1	»	12	–	–	=	=	≡	≡	≡	≡	≡	+	
Moelle lombaire...........	0.8	»	29	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	
Moelle dorsale	0.8	»	29	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	

De tous ces faits, on doit conclure que l'absorption, quantitativement non qualitativement différente des trois types de neurones périphériques à l'égard de la toxine tétanique permet, dans une certaine mesure, d'expliquer l'ordre d'apparition des symptômes moteurs. C'est ainsi que chez le cheval, le trismus précoce pourrait s'expliquer par le fait que le nerf massétérin absorbe plus rapidement la toxine que les autres nerfs moteurs. Peut-être même la rapidité d'absorption résulte-t-elle seulement des dimensions de la cellule nerveuse.

On peut supposer, en effet, que la brièveté seule du neurone massétérin en rend plus rapide la saturation par la toxine. La conséquence de cette saturation rapide, c'est que le neurone cérébral avec lequel s'articule le neurone massétérin sera lui-même plus rapidement atteint. Quoi qu'il en soit, il est un fait que ces constatations ne contribuent pas à éclaircir : nous voulons parler de la nature purement motrice des symptômes tétaniques. Après avoir constaté la présence de la toxine tétanique dans les nerfs périphériques, on pouvait supposer qu'elle était spécialement absorbée par le neurone périphérique moteur. Le fait que les différents neurones périphériques l'absorbent également nous semble être en faveur de l'hypothèse d'après laquelle la localisation toxique spécifique se produit, non dans le neurone périphérique, mais plus haut, dans les neurones cérébraux : les neurones périphériques ne constitueraient que des canaux par lesquels la toxine atteint les neurones cérébraux.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE

des substances actives des sérums normaux.

Sur la pluralité des alexines.

PAR LE Dr L. REMY.

Tandis que Buchner (1) et Bordet (2) sont partisans de l'unité des alexines hémolytique et bactériolytique, Metchnikoff (3) admet l'existence de deux alexines : l'une hémolytique, l'autre bactériolytique, alors que Ehrlich et Morgenroth (4), Neisser (5), Wechsberg (6) défendent la pluralité des alexines hémolytiques et des alexines bactériolytiques.

Quels sont les faits scientifiques que l'on peut invoquer à l'appui de ces différentes opinions? L'expérience la plus importante sur laquelle se basent les unicistes pour affirmer l'unité des alexines hémolytique et bactériolytique est la suivante : si à un sérum neuf non chauffé on ajoute des bactéries sensibilisées, celles-ci fixent toute la cytase que contenait le sérum, car celui-ci est impuissant non seulement à hémolyser des globules rouges sensibilisés, mais encore à réactiver un sérum bactéricide précédemment privé d'alexines. Le sérum non chauffé ne contenait donc qu'une seule alexine, et celle-ci était à la fois hémolytique et bactériolytique, car, s'il y avait eu deux espèces d'alexines, les bactéries ajoutées d'abord n'auraient utilisé que l'alexine bactériolytique, et l'alexine hémolytique restant dans le sérum aurait alors pu réactiver un sérum hématique préalablement chauffé. Si, au lieu de bactéries sensibilisées, on introduit d'abord des globules rouges sensibilisés dans le sérum, celui-ci sera privé de toute action hémolytique et bactériolytique. Il n'y a donc qu'une seule alexine dans le sérum, et celle-ci est à la fois globulicide et bactéricide.

La théorie de la dualité des alexines : une alexine hémolytique, une alexine bactériolytique, repose sur les faits observés par Metchnikoff (8) dans son travail sur la résorption des cel-

lules, à savoir : 1° que celles-ci sont presque exclusivement phagocytées par les macrophages ; 2° que seuls les extraits macrophagiques : épiploon, ganglions mésentériques et rates possèdent des propriétés hémolytiques.

Les recherches entreprises par Gengou (9), au laboratoire de Metchnikoff, sur l'origine de l'alexine des sérums normaux, ont montré que seuls les polynucléaires produisaient la cytase hémolytique, tandis que les extraits macrophagiques étaient dénués de tout pouvoir microbicide. Plus récemment, Tarassévitch (10), dans un travail exécuté au laboratoire de Metchnikoff sur les cytases, a prouvé que seuls les organes macrophagiques et les glandes digestives étaient doués de propriétés hémolysantes, tandis que la moelle osseuse, source principale des microphages, était privée de substance hémolytique, mais possédait une action nettement bactéricide. Les propriétés différentes des organes et des extraits doivent donc être attribuées à la présence dans ceux-ci de cytases distinctes, l'une produite par les macrophages, c'est la macrocytase ou cytase hémolytique, l'autre provenant des microphages, c'est la microcytase ou cytase bactériolytique.

La pluralité des alexines ou compléments a surtout été défendue par Ehrlich et Morgenroth (4), Neisser (5), Wechsberg (6); il importe toutefois de remarquer que des expériences sur lesquelles ils s'appuient pour admettre l'existence de plusieurs espèces d'alexines, hémolytiques et bactériolytiques, ne sont pas décisives. Neisser (5) attire l'attention sur le fait que le sérum de lapin peut, par l'adjonction de bacilles charbonneux, être privé de ses propriétés bactéricides, tout en conservant son action hémolytique. Wechsberg (6) fait la même constatation pour le sérum de chèvre vis-à-vis du vibrion de Nordhafen et des globules rouges de cobayes. Le sérum de chèvre, par l'adjonction de sang de cobaye, perd ses propriétés hémolytiques, mais il conserve son action bactéricide vis-à-vis du vibrion de Nordhafen.

Seulement, ces savants ont opéré avec des éléments normaux, et Bordet a montré que la cytase n'est pas intégralement fixée par les éléments non sensibilisés, puisque le sérum, quand il se montre inactif vis-à-vis de ceux-ci, peut encore dissoudre des éléments sensibilisés. De ces observations, ces

auteurs ne peuvent donc pas conclure d'une façon absolue à la pluralité des alexines.

Cet exposé succinct montre que la question du nombre des alexines est loin d'être résolue à l'heure présente. La théorie dualiste paraît cependant être celle qui cadre le mieux avec certains faits nouveaux actuellement établis; seulement, comme le fait judicieusement remarquer Tarassévitch (10) dans son mémoire sur les cytases, il manque à cette théorie la consécration que lui apporterait la preuve de l'existence des deux cytases hémolytique et bactériolytique dans le même sérum sanguin.

C'est cette preuve que M. Metchnikoff a bien voulu nous charger de rechercher lors d'un séjour de quelques mois que nous avons fait à l'Institut Pasteur, dans le courant de l'année dernière. Commencées à son laboratoire, les recherches qui font l'objet du présent mémoire ont été achevées à l'Institut chimique et bactériologique de l'État, à Gembloux.

Nous prions donc M. Metchnikoff d'agréer l'expression de notre profonde reconnaissance non seulement pour le sujet qu'il a bien voulu nous confier, mais encore pour la bienveillance avec laquelle il nous a ouvert ses laboratoires, ainsi que pour les précieux conseils qu'il nous a donnés pendant le séjour que nous y avons fait.

Pour résoudre la question qui fait l'objet de ce mémoire, nous nous sommes adressé au sérum de rats blancs, dont nous avons étudié les propriétés bactéricides et hémolytiques vis-à-vis des éléments normaux et sensibilisés.

A. *Propriétés bactéricides du sérum de rat blanc vis-à-vis de la bactéridie.* Le pouvoir bactéricide du sérum de rat blanc vis à vis de la bactéridie fut découvert par Behring (15) en 1888, et invoqué par lui pour expliquer l'immunité du rat à l'égard de la bactéridie. En 1891, Metchnikoff et Roux (16) montrèrent que les rats n'étaient qu'exceptionnellement réfractaires au charbon, alors que le sérum de tous les rats, même de ceux qui contractaient la maladie, possédait des propriétés bactéricides pour le bacille charbonneux; il n'y avait donc aucun rapport à établir entre l'action bactéricide des humeurs et l'immunité. En 1897, Sawtchenko (14) reprit l'étude des propriétés bactéricides du sérum des rats à l'égard des vaccins I et II. Il constata :

1° que l'action bactéricide était plus puissante vis-à-vis du vaccin I que du vaccin II; 2° que les substances bactéricides résistaient à la température de 55 à 56° pendant une demi-heure, mais que leur action s'affaiblissait par le chauffage à 60-61° pendant une demi-heure; 3° que le sérum de rat immunisé contre la bactéridie n'était pas plus bactéricide que le sérum de rat neuf; 4° que l'on pouvait habituer la bactéridie à vivre dans le sérum de rat blanc.

En 1890, Bordet (11) admet qu'il peut exister dans le sérum de rat des substances bactéricides autres que les alexines. En 1900, Danysz (12) a confirmé ce fait et a précisé le mécanisme par lequel la bactéridie résistait à l'action microbicide du sérum de rat. En 1902, Malvoz (13) conclut qu'il y a dans le sérum de rat deux substances actives très différentes : une alexine semblable à l'alexine de sérum neuf, et une autre substance qui n'est peut-être pas une alexine, douée de propriétés bactéricides et résistant à 56°.

Les résultats auxquels nous sommes arrivé dans le présent mémoire étant en contradiction avec les conclusions des différents savants dont nous venons de rappeler les travaux, nous croyons faire œuvre utile en exposant avec quelques détails les expériences que nous avons entreprises sur cette question.

Pour nos recherches, nous nous sommes servi de la bactéridie charbonneuse provenant des collections de l'Institut Pasteur. Nous avons employé des cultures sur gélose âgées de 18 à 20 heures, dont nous émulsionnions soigneusement une petite quantité dans 10 c.c. d'eau physiologique. Pour chaque expérience, 5 rats blancs étaient saignés et nous opérions avec le mélange des sérums. Celui-ci a été réparti dans de petits tubes en verre. Ces tubes étaient ensemencés avec la même anse en platine, et, après 18 à 20 heures de séjour à l'étuve à 37°, nous prélevions de chacun d'eux une anse de liquide que nous étalions sur gélose inclinée: nous notions le développement après 24 heures de séjour à l'étuve, 37°. Nous avons toujours rejeté les sérums rouges. En appliquant ces données, nous avons entrepris de nombreuses expériences, parmi lesquelles nous choisissons celles qui permettent d'établir rapidement les conditions dans lesquelles il faut se placer pour obtenir des résultats semblables à ceux auxquels nous sommes arrivé.

I

LE POUVOIR BACTÉRICIDE DU SÉRUM DE RAT NE SE MANIFESTE QU'A LA CONDITION QUE L'ENSEMENCEMENT SOIT PRATIQUÉ AVEC DES DOSES CONVENABLES.

Sawtchenko l'avait déjà montré pour les vaccins I et II. Nous avons confirmé ce fait pour la bactéridie. Si à des tubes contenant 20 gouttes de sérum de rat ou d'eau physiologique, on ajoute une, deux ou trois anses d'une émulsion de bactéridies, on constatera que lorsque la quantité des germes ensemencés est trop forte, ceux-ci se développent dans le sérum et dans l'eau physiologique. Si les bactéries sont introduites en trop faible quantité, les cultures sont négatives, tant dans le sérum que dans l'eau physiologique, alors que, cependant une expérience de contrôle montre qu'il y avait bien eu apport de bactéridies lors de l'ensemencement. Pourquoi les bactéridies introduites dans les tubes de sérum de rats ou d'eau physiologique ne s'y sont-elles pas développées ? Sont-elles mortes parce qu'elles rencontraient des substances bactéricides, ou parce qu'elles ne pouvaient vivre faute d'éléments nutritifs ? L'addition de deux gouttes de bouillon de bœuf à chacun des tubes de sérum et d'eau physiologique permet de résoudre cette question. Dans les tubes de de rat additionné de bouillon, la bactéridie donne quand même une culture négative ; l'absence de développement dans ce sérum est donc due à la présence d'une substance bactéricide. Dans les tubes d'eau physiologique additionnés de bouillon, on obtient une culture riche en bactéridies, l'absence de développement en eau physiologique seule est donc imputable au manque d'éléments nutritifs.

II

COMMENT SE COMPORTE LA SUBSTANCE BACTÉRICIDE DU SÉRUM DE RAT VIS-A-VIS DE LA CHALEUR ?

L'expérience suivante répond à cette question.

EXPÉRIENCE I

NATURE du liquide ensemencé.	NOMBRE d'anses ensemencées.	DÉVELOPPEMENT après 24 h. des tubes de gélose inclinée, ensemencés avec une anse des tubes de la colonne 1, après un séjour de 24 h. à 37°.
Sérum rat non chauffé, 20 g. + 2 g. bouillon.	1 anse	0
— — — — — —	2 anses	0
— — — — — —	3 —	0
Sérum rat ch. 55-56°, 20 g. + 2 g. bouillon.	1 anse	0 (1)
— — — — — —	2 anses	+ (2)
— — — — — —	3 —	+
Sérum rat ch. 60-61°, 20 g. + 2 g. bouillon.	1 anse	+
— — — — — —	2 anses	+
— — — — — —	3 —	+
Eau physiolog., 20 g. + 20 g. bouillon.	1 anse	+
— — — — —	2 anses	+
— — — — —	3 —	+
Eau physiolog. seule, 20 gouttes	1 anse	0
— — — —	2 anses	100
— — — —	3 —	+

1. 0 indique l'absence de colonies.
2. + indique que le nombre de colonies est trop élevé pour qu'on puisse les compter.

Elle nous apprend que, dans les mêmes conditions, le sérum de rat non chauffé est nettement bactéricide, tandis que chauffé à 55-56°, il l'est peu, et que, chauffé à 60-61°, il ne l'est plus.

Toutefois, par un ensemencement moins copieux, on peut mettre en lumière les propriétés bactéricides du sérum de rat chauffé à 55-56° ou à 60-61°, pendant 35 minutes. Pour obtenir ce résultat, il faut ensemencer une dose de bactéridies telle que l'eau physiologique, additionnée de bouillon, donne une culture abondante sur gélose, tandis que l'eau physiologique seule n'en donne pas.

Conclusions : 1° le sérum de rat blanc contient une substance bactéricide vis-à-vis de la bactéridie charbonneuse ; 2° l'intensité du pouvoir bactéricide, bien qu'affaiblie par l'action des températures 55-56°, 60-61°, pendant 35 minutes, se manifeste encore.

III

COMMENT SE COMPORTE LE SÉRUM DE RAT VIS-A-VIS D'ORGANISMES AUTRES QUE LA BACTÉRIDIE ?

Les expériences que nous avons entreprises en ensemençant les bacilles *coli*, fluorescent non liquéfiant, *mesentericus*, *proteus vulgaris*, typhique, choléra Dantzig, nous ont permis de constater que le sérum de rat non chauffé est nettement bactéricide pour ces bactéries, alors que, chauffé à 55-56° pendant 35 minutes, il constitue un excellent milieu de culture. Le détail de ces expériences ne présentant pas d'intérêt particulier, nous nous contenterons de donner l'étude des propriétés du sérum de rat blanc vis-à-vis du bacille typhique et du choléra Dantzig.

Bacille typhique. — Nous avons étudié comparativement l'action du sérum de lapin et de rat blanc sur le bacille typhique. Les dilutions ont été pratiquées à l'aide d'une culture en bouillon âgée de 20-24 heures. Le nombre de bacilles contenus dans un anse d'ensemencement s'élevait à 70.

EXPÉRIENCE II.

NATURE du liquide de culture.	NOMBRE d'anses ensemencées.	DÉVELOPPEMENT après 24 h. des tubes de gélose inclinée, ensemencés avec une anse des tubes de la colonne 1, après un séjour de 24 h. à 37°.
Sérum rat non ch., 20 g. + 2 g. bouillon.	1 anse	0
— — — — — —	2 anses	0
— — — — — —	3 —	0
Sérum lapin non ch., 20 g. + 2 g. bouillon.	1 anse	0
— — — — — —	2 anses	0
— — — — — —	3 —	0
Sérum rat chauffé, 20 g. + 2 g. bouillon.	1 anse	110
— — — — — —	2 anses	150
— — — — — —	3 —	250
Sér. lapin ch. 55-56°, 20 g. + 2 g. bouillon.	1 anse	+
— — — — — —	2 anses	+
— — — — — —	3 —	+

Il ressort de cette expérience : 1° que les sérums non chauffés de rat et de lapin sont doués de propriétés nettement bactéricides vis-à-vis du bacile typhique Halle; 2° que, comparé au sérum de lapin chauffé, le sérum de rat porté pendant 35 minutes à la température de 55-56°, manifeste encore une action bactéricide, mais celle-ci est considérablement atténuée. Toutefois ces résultats ne s'obtiennent que si l'on opère avec du sérum clair et que si l'ensemencement est peu copieux.

Bacille du choléra Dantzig. — Le bacille du choléra Dantzig se prête difficilement aux expériences; pour cette bactérie en effet, le nombre de germes ensemencés et la qualité du sérum employé jouent un rôle plus important que lorsqu'il s'agit du bacille typhique Halle et surtout de la bactéridie. Alors que le nombre de germes est relativement peu élevé, 50 environ par anse, le sérum de rat chauffé à 55-56° pendant 35 minutes est dépourvu de propriétés bactéricides. Lorsque le nombre de germes ensemencés est beaucoup plus faible, 10 environ par anse, l'expérience nous apprend que le sérum de rat chauffé à 55-56° est doué de faibles propriétés bactéricides vis-à-vis du bacille du choléra Dantzig.

Conclusions : 1° le sérum de rat non chauffé est bactéricide pour des organismes autres que la bactéridie charbonneuse. 2° le sérum de rat, chauffé pendant 35 minutes à la température de 55-56°, manifeste encore une action bactéricide vis-à-vis de ces mêmes organismes, mais celle-ci est considérablement atténuée.

B. *Propriétés hémolytiques du sérum de rat à l'égard des globules non sensibilisés.* — On sait que la plupart des sérums normaux sont doués de propriétés hémolysantes vis-à-vis des hématies d'espèces différentes. Après quelques essais comparatifs, nous avons constaté que les globules rouges de poule étaient particulièrement sensibles à l'action dissolvante du sérum de rat. L'expérience III a été effectuée avec le sérum de 6 rats, afin de pouvoir comparer l'action hémolytique et bactériolytique de celui-ci dans des conditions identiques.

L'étude du pouvoir hémolytique du sérum de rat vis-à-vis des globules rouges du sang de poule nous permet de constater : 1° que le sérum de rat non chauffé est fortement hémolytique pour les globules rouge de poule; 2° que le sérum de rat,

Expérience III.

HÉMOLYSE		
LIQUIDE employé pour l'hémolyse.	QUANTITÉ de globules ajoutés.	RÉSULTAT après 2 h. de séjour à 37°.
Sérum rat non chauffé, 20 gouttes.......	1 goutte sang.	Nette.
Sér. rat non ch., 10 g. + 10 g. eau physiol.	—	—
— — 15 g. + 15 g. —	—	—
— — 2 g. + 18 g. —	—	—
Sérum rat chauffé 56°, 20 gouttes........	1 goutte sang.	Néant.
— — — 56°, —	1/5 —	—
— — — 56°, —	1/10 —	—

BACTÉRIOLYSE		
NATURE du liquide ensemencé.	NOMBRE d'anses ensemencées.	DÉVELOPPEMENT après 24 h des tubes de gélose inclinée, ensemencés avec une anse des tubes de la colonne 1, après un séjour de 24 h à 37°.
Sérum rat non chauffé, 20 g. + 2 g. bouill.	1 anse	0
— — — — — —	2 anses	0
— — — — — —	3 —	0
Sérum rat ch., 55-56°, 20 g. + 2 g. bouillon.	1 anse	0
— — — — — —	2 anses	0
— — — — — —	3 —	0
Sérum rat ch. 60-61°, 20 g. + 2 g. bouillon.	1 anse	2
— — — — — —	2 anses	70
— — — — — —	3 —	+
Eau physiol., 20 goutt. + 2 goutt. bouillon	1 anse	+
— — — — —	2 anses	+
— — — — —	3 —	+
Eau physiolog. seule, 20 gouttes.........	1 anse	0
— — — —	2 anses	0
— — — —	3 —	0

chauffé pendant 35 minutes aux températures de 55-56° est complètement privé de ses propriétés hémolysantes.

Si nous comparons l'action hémolytique et l'action bactério-

lytique du sérum de rat, nous pourrons conclure que le sérum de rat possède une substance bactériolytique qui résiste à l'action des températures 55-56°, 60-61° et une substance hémolytique qui est détruite par l'action de ces températures.

La substance hémolytique présentant les caractères des alexines a été considérée comme telle par tous les savants. Si donc nous pouvions établir que la substance bactéricide du sérum de rat est également une alexine, nous nous trouverions en présence d'un sérum dans lequel les alexines hémolytique et bactériolytique seraient distinctes.

Propriétés du sérum de rat blanc vis-à-vis des éléments sensibilisés. Propriétés bactéricides. — La substance bactéricide du sérum de rat est une alexine. Plusieurs recherches ont été faites déjà dans le but de déterminer la nature de la substance bactéricide du sérum de rat. Les différents savants qui se sont occupés de cette question sont unanimes pour lui refuser la qualité d'alexine. Nous croyons cependant que celle-ci est une alexine, et cela pour les raisons suivantes : 1° le sérum de rat, chauffé à 56°, manifeste des propriétés bactéricides non seulement à l'égard de la bactéridie, mais aussi envers d'autres bactéries, et son action microbicide est d'intensité trop variable à l'égard des différents organismes pour qu'on puisse l'attribuer à la présence d'une substance antiseptique; 2° nous avons antérieurement attiré l'attention sur le fait que le chauffage atténue les propriétés bactéricides du sérum de rat, et qu'on ne parvient plus alors à les mettre en évidence qu'en ensemençant des quantités moins fortes que pour le sérum non chauffé, et parfois même des doses très faibles. Le nombre de germes ensemencés joue donc un rôle considérable. Dans ces conditions, la perte de la propriété de transformer les vibrions, même sensibilisés, en granules n'est pas une réaction assez sensible pour qu'on puisse en conclure à la disparition de l'alexine dans le sérum de rat chauffé à 56°. Pour que l'étude du phénomène de Pfeiffer soit possible il faut, en effet, pouvoir opérer avec des doses relativement fortes de vibrions, et, s'il existe peu d'alexine dans le sérum, la faible quantité de granules échappe facilement à l'examen microscopique; 3° enfin pour refuser à la substance bactéricide du sérum de rat la qualité d'alexine, il faudrait aussi qu'elle fut inapte à réactiver les sérums sensibilisés, et jusqu'ici

aucune expérience n'a été tentée dans cette voie. Pour combler cette lacune, nous avons étudié ce pouvoir réactivant vis-à-vis des sérums sensibilisés contre le vibrion cholérique.

Le sérum de rat chauffé peut réactiver le choléra-sérum. — Nous avons fait dans la cavité péritonéale d'un lapin 20 injections de bacille du choléra Dantzig. Huit jours après la dernière, nous saignons le lapin et son sérum sert à l'expérience IV.

Dans cette expérience le sérum de lapin vacciné non chauffé, I, est nettement bactéricide; le sérum du même lapin chauffé, II, de même que le sérum chauffé à 55-56° d'un lapin neuf, V, donnent une culture abondante du bacille du choléra Dantzig. Si à 10 gouttes de sérum, chauffé à 56° du lapin vacciné

EXPÉRIENCE IV.

	NATURE du liquide ensemencé.	NOMBRE d'anses ensemencées.	DÉVELOPPEMENT ap. 24 h. des tubes de gélose ensemencés avec une anse des tubes de la colonne 1, ap. un séjour de 24 h. à 37°.
I.	Sér. lap. vacc. non ch., 20 g. + 2 g. bouillon.	1 anse	0
	— — — — — —	2 anses	0
	— — — — — —	3 —	0
II.	Sér. lap. vacc. ch. 55-56°, 20 g. + 2 g. bouill.	1 anse	+
	— — — — — —	2 anses	+
	— — — — — —	3 —	+
III.	Sér. rat ch. 55-56°, 20 gout. + 2 gout. bouill.	1 anse	45
	— — — — — —	2 anses	130
	— — — — — —	3 —	210
IV.	Sér. lap. vacc. ch., 10 g. + 10 g.. sér. rat. ch. + 2 gouttes bouillon	1 anse	25
	— — — — —	2 anses	50
	— — — — —	3 —	140
V.	Sérum lapin neuf ch., 20 g. + 2 g. bouill.	1 anse	+
	— — — — — —	2 anses	+
	— — — — — —	3 —	+
VI.	Sér. lapin neuf ch., 10 g. + 10 g. sér. rat ch. + 2 gouttes bouillon	1 anse	+
	— — — — —	2 anses	+
	— — — — —	3 —	+

et du lapin neuf, on ajoute 10 gouttes de sérum de rat chauffé à 55-56 pendant 35 minutes, le sérum chauffé du lapin vacciné récupère ses propriétés bactéricides, IV, alors que le sérum du lapin neuf reste favorable au développement du bacille du choléra Dantzig VI, or le sérum chauffé du lapin vacciné ne diffère du sérum chauffé du lapin neuf que parce qu'il contient la choléra-sensibilisatrice, laquelle ne peut être réactivée que par une alexine.

Le sérum du rat chauffé à 55-56 contenait donc une alexine bactériolytique.

Propriétés hémolytiques du sérum de rat chauffé vis-à-vis des hématies sensibilisées. — L'alexine qui persiste dans le sérum de rat chauffé à 55-56 est incapable de réactiver les hémosérums préalablement chauffés. Nous avons poussé dans la cavité péritonéale d'une poule 4 injections de 5 c. c. de sang de lapin défibriné et lavé. Huit jours après la dernière injection nous avons étudié les propriétés réactivantes du sérum de rat vis-à-vis des hématies de lapin sensibilisées, et nous avons constaté que le sérum de poule sensibilisé contre les globules rouges de lapin est réactivé par le sérum de rat non chauffé, tandis qu'il reste inactif si on lui ajoute le même sérum de rat préalablement chauffé pendant 35 minutes à 55-56°.

On sait qu'il existe parfois de légères différences individuelles entre le sérum des rats blancs, et que l'absence ou la présence d'hémoglobine dissoute influence considérablement le résultat.

Tant pour éliminer ces deux causes d'erreur, que pour condenser nos recherches sur les éléments sensibilisés, nous avons entrepris une dernière expérience avec le sérum clair de 8 rats blancs, que nous avons fait agir sur du cholérasérum provenant d'un lapin qui avait reçu dans le péritoine 24 injections de 2 c. c. de culture en bouillon âgée de 24 heures de choléra Dantzig, et sur de l'hémosérum fourni par un cobaye qui avait reçu 12 injections intrapéritonéales de 5 c. c. de sang défibriné et lavé.

Les résultats sont consignés dans le tableau ci-après.

Il résulte de cette expérience : 1° que le mélange du sérum de lapin vacciné chauffé, II (qui constitue un milieu de culture favorable au développement du bacille du choléra Dantzig), et du sérum de rat chauffé donne un liquide manifestement doué de propriétés bactéricides pour cet organisme IV. Le sérum de rat

chauffé contient donc une alexine bactériolytique qui a résisté à la température de 55-56 pendant 35 minutes; 2° que le même sérum de rat chauffé à 55-56° pendant 35 minutes est dépourvu de tout pouvoir réactivant vis-à-vis des globules rouges de poule fortement sensibilisés.

Expérience V

BACTÉRIOLYSE

	NATURE du liquide ensemencé.	NOMBRE d'anses ensemencées.	DÉVELOPPEMENT ap. 24 h. des tubes de gélose inclinée, ensemencés avec une anse des tubes de la col. 1, ap. 24 h. de séjour à 37°.
I.	Sér. lap. vacc. non ch., 20 g. + 2 g. bouill	1 anse	0
	— — — — — —	2 anses	0
	— — — — — —	3 —	0
II.	Sér. lapin vacciné ch., 20 g. + 2 g. bouill.	1 anse	180
	— — — — — —	2 anses	+
	— — — — — —	3 —	+
III.	Sér. rat chauffé, 20 goutt. + 2 goutt. bouill.	1 anse	0
	— — — — —	2 anses	60
	— — — — —	3 —	250
IV.	Sér. lapin vacc. ch., 10 g. + 10 g. sér. rat chauffé + 2 gouttes bouillon...........	1 anse	0
	— — — — — —	2 anses	0
	— — — — — —	3 —	19
V.	Sér. lap. neuf ch., 10 g. + 10 g. sér. rat ch. + 2 gouttes bouillon..................	1 anse	+
	— — — — — —	2 anses	+
	— — — — — —	3 —	+

HÉMOLYSE

NATURE du liquide hémolytique.	NOMBRE de gouttes de sang de lapin ajoutées.	RÉSULTAT après 2 h. à 37°.
Sérum cobaye vacciné non chauffé, 20 gouttes.	1 goutte	Nette
— — — chauffé, 20 gouttes....	1 —	Néant
Sér. cob. vacc. chauffé, 10 g. + 10 g. sér. rat ch.	1 —	—
— — — — — — —	1/10 —	—

CONCLUSIONS GÉNÉRALES :

1° Le sérum de rat non chauffé est bactéricide pour la plupart des bactéries ;

2° L'action d'une température de 55-56° pendant 35 minutes atténue sans les annihiler les propriétés bactéricides du sérum de rat vis-à-vis de la bactéridie, du bacille typhique Halle, du choléra Dantzig ;

3° La substance bactéricide qui, dans le sérum de rat, résiste à l'action de la chaleur est une alexine ;

4° L'alexine qui dans le sérum de rat résiste à l'action de la chaleur 55-56° n'est pas hémolytique, puisqu'elle est incapable de réactiver les hémosérums. En conséquence l'alexine qui dans le sérum de rat préside aux phénomènes bactériolytiques est différente de celle qui intervient dans la dissolution des globules rouges. Toutefois les expériences actuelles ne permettent pas de conclure s'il existe dans le sérum de rat une ou plusieurs alexines hémolytiques et bactériolytiques.

(Institut chimique et bactériologique de l'État, à Gembloux,

Novembre 1902.)

BIBLIOGRAPHIE

1) Buchner, *Verhand. des Congr. f. in Med. Wiesbaden*, 1892.
2) Bordet, ces *Annales*, 1900.
3 Metchnikoff, ces *Annales*, 1899.
4) Ehrlich et Morgenroth, *Berl. Klin. Woch.*, 1899-1900-1901.
5) Neisser, *Deut. Med. Woch.*, 1900.
6) Wechsberg, *Wien. Klin. Woch.*, 1901.
8) Metchnikoff, ces *Annales*, 1899.
9) Gengou, ces *Annales*, 1901.
10) Tarassevitch, ces *Annales*, 1902.
11) Bordet, ces *Annales*, 1899.
12) Danysz, ces *Annales*, 1900.
13) Malvoz, ces *Annales*, 1902.
14) Sawtchencko, ces *Annales*, 1897.
15) Behring, *Centralb. f. Klin. Med.*, 1888.
16) Metchnikoff et Roux, ces *Annales*, 1891.

Sur la non-existence des « neutrophiles » d'Ehrlich

dans le sang de l'homme et du singe.

Par F. MARINO.

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

La méthode chromatique, morphologique et histochimique a permis à Ehrlich de conclure à l'existence de trois sortes de granulations dans les leucocytes de l'homme et du singe :

1° *Granulations éosinophiles ou oxyphiles* (α d'Ehrlich), se colorant bien par les couleurs acides;

2° *Granulations basophiles* ou *granulations métachromatiques* dans les mastzellen (γ), prenant les couleurs basiques;

3° *Granulations neutrophiles* (ε), *n'ayant d'affinité ni pour les couleurs avides ni pour les couleurs basiques, et que seuls peuvent colorer les mélanges neutres.*

Poussant plus loin ses recherches, et se basant toujours sur la classification des granulations, Ehrlich a formulé une classification des leucocytes en leucocytes *granuleux* et *non granuleux* :

Dans le 1er groupe (leucocytes granuleux), Ehrlich range :

1° Les leucocytes de transition ou formes de passage;

2° Les leucocytes polynucléaires neutrophiles ;

3° Les leucocytes polynucléaires éosinophiles ;

4° Les mastzellen.

Dans le 2e groupe (leucocytes non granuleux) prennent place :

1° Les lymphocytes;

2° Les gros leucocytes mononucléaires.

L'hématologie s'est arrêtée à ces conceptions et il est courant d'employer les termes d'*éosinophiles* et de *neutrophiles*.

Cette particularité, qu'on ne rencontrait de granulations neutrophiles que dans le sang de l'homme et du singe, et aussi l'intérêt qu'il pouvait y avoir à connaître la valeur physiologique de ces granulations nous ont décidé à faire de nouvelles recherches.

Tout d'abord une question se pose :

L'affinité neutrophile est-elle une propriété absolue de certaines granulations, ou bien simplement une qualité mise en relief par certains modes de fixation, que l'on doit employer pour colorer les neutrophiles?

Rappelons, en passant, que, par couleur neutre, on désigne la matière colorante qui résulte du mélange d'une couleur acide et d'une couleur basique.

Quant au « triacide [1]» Ehrlich désigne sous ce nom une couleur neutre qu'il juge *indispensable* dans la coloration des granulations neutrophiles.

Voici, d'ailleurs, en quels termes il [2] s'exprime à ce sujet :

La coloration par le triacide constitue une technique très commode. Elle est très recommandable quand on veut avoir des préparations d'ensemble; elle est indispensable (unentbehrlich) *dans tous les cas où nous avons affaire à des granulations neutrophiles.*

Et plus loin [3], parlant, à propos des leucocytes polynucléaires, de granulations neutrophiles, il dit :

Le noyau se colore fortement par tout colorant nucléaire; le protoplasma possède une affinité très vive pour la plupart des substances colorantes acides, et il est caractérisé, sans aucun *doute* (unverkennbar) *par la présence d'une grande quantité de granulations neutrophiles.*

Ehrlich rencontre ces mêmes granulations dans le protoplasma des gros mononucléaires, des myélocytes et des *petits pseudolymphocytes neutrophiles* [4].

Donc, pour lui, ces granulations très petites, des leucocytes de l'homme et du singe, se colorent *exclusivement* par les mélanges neutres, d'où le nom de *granulations neutrophiles* et celui de *leucocytes mono* et *polynucléaires*, de *myélocytes* et de *petits*

1. La composition du triacide est la suivante :

Solution saturée d'orange G.	13 c. c.
— — de fuchsine acide	6 —
Eau distillée	15 —
Alcool	15 —
Solution saturée de vert de méthyle	12 —
Alcool	10 —
Glycérine	10 —

2. Ehrlich und Lazarus. *Anaemie, in Nothnagel Specielle Pathologie und Therapie*, p. 29.

3. *Idem*, p. 50.

4. *Id.*, p. 52.

pseudolymphocytes neutrophiles, donnés aux globules blancs qui les contiennent.

Nous avons répété les expériences de M. Ehrlich, et nous avons remarqué, en effet, qu'en suivant la technique qu'il indique, — fixation à 110° pendant 15-20 minutes, — on colore à l'aide du triacide les certaines granulations dites *neutrophiles;* mais nous avons vu aussi qu'en modifiant cette technique, le triacide, loin d'être indispensable, est inutile et peut être remplacé par des couleurs acides.

Voici notre procédé : on met sur une lamelle très propre une goutte de sang que l'on étale en faisant glisser sur elle une autre lamelle. Le sang est immédiatement coloré, soit par une solution aqueuse de fuchsine acide à 10 0/0, soit par une solution faible 1 0/0, soit enfin par une solution aqueuse d'éosine, 1/100, 1/1000, 1/10,000, 1/50,000, et quelquefois même par des solutions beaucoup plus faibles. D'ordinaire on fait agir ces solutions 1 à 5 minutes, ensuite on lave les préparations et, après les avoir séchées, on les monte au baume. On voit ainsi, très nettement, les granulations décrites jusqu'à présent comme granulations neutrophiles.

On obtient les mêmes résultats en faisant agir les solutions colorantes sur le sang séché à l'air, pendant 1-2-3 heures, 5-10-20 jours, ou bien sur le sang fixé 10 fois à la flamme, ou à 110°.

Nous ferons remarquer, à propos de la coloration du sang à l'état frais ou séché à l'air, que la solution aqueuse forte ou diluée de fuchsine colore, en même temps que les granulations, les globules rouges; l'éosine, au contraire, en solution aqueuse saturée ou même étendue, n'empêche pas le laquage du sang.

L'avantage de l'éosine sur la fuchsine consiste dans son action colorante sur les granulations, même quand elle est employée en solutions très faibles (1/50,000.

Il nous semblait, après ces premiers essais, que nous étions à même de conclure que la fixation par la chaleur modifiait l'affinité acidophile, en la rendant neutrophile.

Pour contrôler cette manière de voir, nous avons essayé de colorer des préparations du sang préalablement fixées à la chaleur (10 fois à la flamme ou à 110°).

Nous nous sommes aperçu que, dans ces conditions, les granulations des neutrophiles se coloraient encore.

L'opinion de M. Ehrlich sur leur compte nous semblait donc erronée et l'interprétation que nous donnions de notre première expérience était également fausse.

Fixées à la chaleur ou non fixées, les granulations leucocytaires, à l'exception des granulations basophiles, se montraient toutes acidophiles.

Voici les conclusions qui découlent de nos dernières recherches :

1° Il nous paraît évident aujourd'hui que les neutrophiles n'existent pas ;

2° Le triacide, vis-à-vis de granulations des prétendus neutrophiles, ne se montre pas une couleur neutre.

Peut-être la basicité du vert de méthyle est-elle insuffisante pour saturer l'acidité des deux couleurs acides avec lesquelles on fait le mélange, et alors le triacide, par les groupements oxhydriles des deux dernières (orange et fuchsine) agit, vis-à-vis des granulations, comme une couleur purement acide.

Mais, même en admettant que le triacide soit une couleur neutre idéale, on peut très bien admettre que certaines granulations des globules blancs, refusant les autres couleurs du mélange, se laissent colorer seulement par la fuchsine — phénomène très commun dans les procédés de teinture.



Après avoir démontré que les granulations des polynucléaires de l'homme et du singe étaient acidophiles, nous avons entrepris une autre série de recherches, pour voir si elles étaient aussi basophiles.

Grâce au même procédé, nous les avons colorées très facilement, en faisant agir, 15-20 minutes, 1-2 heures, sur des préparations de sang fixé et non fixé, une solution aqueuse saturée ou diluée (1/100; 1/1,000; 1/10,000) de bleu de méthylène. Il faut noter que si le bleu n'est pas de bonne qualité, les granulations restent incolores.

De cette façon nous nous sommes convaincu que les granulations décrites par Ehrlich comme *neutrophiles* sont de véritables granulations *amphophiles*, c'est-à-dire des granulations colora-

bles soit par des couleurs acides, soit par des couleurs basiques. *Il en est de même pour les granulations des éosinophiles.*

Étant donnée la nature de ces granulations, nous trouvons que l'ancienne division en *éosinophiles* et *neutrophiles*, adoptée par Ehrlich et par tous les hématologistes qui l'ont suivi, est impropre, et pour cette raison nous proposons de substituer aux noms de *leucocytes éosinophile* et *neutrophile*, ceux de *leucocytes macro* et *microgranuleux*, et aux noms d'*éosinophilie* et *neutrophilie*, ceux de *macrogranulie* et *microgranulie*.

D'après cette classification, il est naturel de ne pas se servir des dénominations de « *mononucléaires* et de *myélocytes éosinophiles* et *neutrophiles* », mais d'adopter les termes de « *mononucléaires* et *myélocytes macro* et *microgranuleux*.

***

Ayant démontré que le triacide est inutile pour colorer les granulations des éosinophiles et des neutrophiles, et, d'autre part, étant donné que le procédé de coloration avec ce colorant est long et souvent ne donne pas de bons résultats, nous avons essayé de le remplacer par d'autres substances qui colorent rapidement tous les éléments figurés du sang, les microbes, et — sans les différencier — les hématozoaires.

Dans cette nouvelle coloration, nous avons tâché de réunir trois avantages :

1° Rapidité de la fixation, passage 10 fois à la flamme ou fixation à 110° pendant 5 à 6 minutes;

2° Rapidité de la coloration avec une couleur acide — (fuchsine);

3° Rapidité de la coloration avec une couleur basique, — brillant-kresylblau — en dilution telle qu'elle ne puisse neutraliser la couleur acide, tout en pouvant colorer tous les éléments basophiles.

Voici les détails de notre méthode :

On met 1 goutte de sang sur une lamelle bien propre, on l'étend par glissement d'une autre lamelle, on sèche et on passe 10 fois à la flamme du bec Bunsen, en mettant la lamelle sur une lame pour ne pas brûler le sang. La lamelle est tenue sur la lame à l'aide d'une pince. On fait agir la solution aqueuse à 10 0/0 de fuchsine — versée dans un verre de montre —

1. Marino, *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 26 avril et 7 juin 1902.

15 à 20 secondes et quelquefois 2 à 3 minutes), on lave à l'eau, on sèche avec du papier buvard et on fait agir ensuite le brillant — versé aussi dans un verre de montre — de 25 à 30 secondes; — on lave à l'eau, on sèche et on monte au baume.

On peut employer indifféremment soit une solution aqueuse à 1/5,000, soit une solution alcoolique à 1/200 d'alcool absolu. Nous préférons la première qui donne des préparations plus claires.

Au lieu de la solution aqueuse de brillant, on peut se servir aussi d'une solution 1/10,000 d'azur (Nocht), que l'on fait agir 5 secondes. Enfin, on peut se servir de n'importe quelle substance basique (bleu, vert de méthyle), pourvu qu'elles soient très diluées (1/2,000, 1/4,000 d'eau) et agissent très peu de temps 20 à 30 secondes.

Lorsqu'on prolonge pendant 20 à 30 minutes la coloration, par le brillant, de préparations ayant subi préalablement une forte coloration par la fuchsine, on obtient aussi de très belles colorations doubles, dans lesquelles la teinte bleue prédomine.

Les résultats sont supérieurs à ceux que donne, plus laborieusement, d'ailleurs, le triacide d'Ehrlich.

Au lieu de faire la coloration du sang en deux temps, on peut encore se servir du mélange de fuchsine acide et de brillant dans les proportions suivantes :

Fuchsine acide (10 p. 100)........................	1 c. c.
Brillant (solution aqueuse à 1 p. 100)..............	5 —

Il faut préparer ce mélange 3-4 heures avant de s'en servir et le faire agir 5-10 minutes.

Le procédé est applicable au sang, quelle que soit l'espèce animale, supérieure ou inférieure (V. *fig.* 1, *go*), granulations *d'Holotheuria tubulosa*) aux coupes, aux exsudats, aux frottis, ou préparations par contact (rate, ganglions, moelle des os, et autres organes.)



Après avoir démontré qu'on peut colorer les granulations des prétendus neutrophiles, soit avec les couleurs acides, soit avec les couleurs basiques, nous nous sommes demandé quelle est la nature chimique intime de cette variété de granulations. La réponse n'est pas facile. On peut penser que ces granulations sont peut-être constituées par des groupements moléculaires de

nature acide et par des groupements moléculaires de nature basique. Les premiers, s'ils existaient, auraient de l'affinité pour les couleurs (basiques basophiles) et les seconds auraient de l'affinité pour les couleurs acides, (acidophiles). On peut admettre l'existence de ces deux espèces de groupements, sans préciser davantage leurs relations numériques.

Au moment de rédiger notre mémoire, nous venons de parcourir un livre de C. Levaditi[1] (Bucarest), avec préface de P. Ehrlich.

A la page 42, nous lisons: « *Les granulations neutrophiles ont de particulier que fixées par la chaleur* (110°) *elles ne se colorent ni avec les pigments basiques ni avec les couleurs acides. Néanmoins, Marino affirme que les granulations renfermées dans les polynucléaires de l'homme retiennent*, DANS CERTAINES CONDITIONS DE FIXATION, *soit les pigments acides, soit les couleurs basiques, et que par conséquent la propriété dite neutrophilie n'est pas réelle. Il y a lieu pourtant de remarquer que Marino emploie comme moyen de fixation non pas le chauffage à* 110°, *tel qu'il a servi à Ehrlich pour établir le caractère distinctif de ces granulations neutrophiles, mais une courte élévation de température.* » Donc, d'après Ehrlich, pour établir le caractère distinctif, ou, pour mieux dire, la nature chimique d'un élément cellulaire, il faut le fixer à 110°.

Les résultats des nos recherches nous empêchent de partager ces idées.

D'ailleurs nous n'avons jamais dit ni écrit que les granulations renfermées dans les polynucléaires de l'homme retenaient, DANS CERTAINES CONDITIONS DE FIXATIONS, SOIT LES PIGMENTS ACIDES, SOIT LES COULEURS BASIQUES; mais nous avons dit et répété que « LES GRANULATIONS DÉCRITES PAR EHRLICH COMME NEUTROPHILES RETENAIENT TOUJOURS LES COULEURS DÉCRITES PAR ET LES COULEURS BASIQUES, SOIT COLORÉES A L'ÉTAT FRAIS, SOIT SÉCHÉES A L'AIR, SOIT FIXÉES 10 FOIS A LA FLAMME, SOIT FIXÉES à 110° ».

Nous remercions vivement notre illustre maître M. Metchnikoff de l'intérêt qu'il a bien voulu prendre à nos recherches.

Paris, 6 novembre 1902.

1. C. Levaditi, *Le Leucocyte et ses granulations*. C. Naud, éditeur, 1902.

EXPLICATION DE LA PLANCHE VII

Fig. 1. — Sang d'homme à l'état frais. Coloration à l'éosine, 1/10,000, (Leitz 1/16. Imm. homog. oc. 3) : *ma*, *ma*, amphophiles macrogranuleux (éosinophiles suivant l'ancien langage d'Ehrlich); *mi*, *mi*, amphophiles microgranuleux (neutrophiles, suivant l'ancien langage d'Ehrlich); *go*, granulations d'un leucocyte d'*Holothuria tubulosa*.

Fig. 2. — Le même sang à l'état frais. Coloration au bleu de méthylène, 1/100 : *r*, globule rouge; *ma*, *ma*, amphophiles macrogranuleux; *mi*, *mi*, amphophiles microgranuleux; *mo*, mononucléaire; *ly*, lymphocyte; *mas*, mastzellen.

Fig. 3. — Sang normal. Fixation 10 fois à la flamme; coloration de fuchsine et de brillant : *r*, globule rouge; *ma*, amphophile macrogranuleux; *mi*, *mi*, amphophiles microgranuleux; *mo*, mononucléaire.

Fig. 4. — Sang de lapin. Fixation 10 fois à la flamme; coloration à la fuchsine acide et au brillantcresylblau : *r*, globule rouge; *ma*, amphophile macrogranuleux; *mi*, *mi*, amphophiles microgranuleux; *mo*, mononucléaire; *ly*, lymphocyte; *b*, bactéridie charbonneuse.

LES VACCINATIONS ANTIRABIQUES
A L'INSTITUT PASTEUR EN 1902

PAR M. EUGÈNE VIALA
Préparateur au service antirabique.

I

Pendant l'année 1902, 1,106 personnes ont subi le traitement antirabique à l'Institut Pasteur : 3 sont mortes de la rage; chez une d'entre elles, la rage s'est déclarée avant la fin du traitement; cette personne ne sera pas comptée parmi les traitées.

La statistique s'établit donc ainsi :

Personnes traitées	1.105
Morts	2
Mortalité 0/0	0,18

Dans le tableau suivant, ces chiffres sont rapprochés de ceux fournis par les statistiques des années précédentes.

Années.	Personnes traitées.	Morts.	Mortalité 0/0.
1886.	2.671	25	0,94
1887.	1.770	14	0,79
1888.	1.622	9	0,55
1889.	1.830	7	0,38
1890.	1.540	5	0,32
1891.	1.559	4	0,25
1892.	1.790	4	0,22
1893.	1.648	6	0,36
1894.	1.387	7	0,50
1895.	1.520	5	0,33
1896.	1.308	4	0,30
1897.	1.521	6	0,39
1898.	1.465	3	0,20
1899.	1.614	4	0,25
1900.	1.420	4	0,35
1901.	1.321	5	0,38
1902.	1.105	2	0,18

II

Les personnes traitées à l'Institut Pasteur sont divisées en trois catégories correspondant aux tableaux suivants :

Tableau A. — La rage de l'animal mordeur a été expérimentalement constatée par le développement de la maladie chez des animaux mordus par lui ou inoculés avec son bulbe.

Tableau B. — La rage de l'animal mordeur a été constatée par examen vétérinaire.

Tableau C. — L'animal mordeur est suspect de rage.

Nous donnons ci-après la répartition, entre ces catégories, des personnes traitées en 1902.

	MORSURES à la tête.			MORSURES aux mains.			MORSURES aux membres.			TOTAUX		
	Traités.	Morts.	Mortalité 0/0.	Traités.	Morts.	Mortalité 0/0.	Traités.	Morts.	Mortalité 0/0.	Traités.	Morts.	Mortalité 0/0.
Tableau A.	20	0	0	87	2	2,30	43	0	0	150	2	1,33
Tableau B.	51	0	0	405	0	0	169	0	0	625	0	0
Tableau C.	21	0	0	190	0	0	119	0	0	330	0	0
	92	0	0	682	2	0,29	331	0	0	1.105	2	0,18

III

Au point de vue de leur nationalité, les 1,105 personnes traitées se répartissent de la façon suivante :

Angleterre	9
Espagne	2
Grèce	1
Hollande	1
Russie	2
Suisse	1

Soit 16 étrangers et 1,089 Français.

Voici la répartition par départements des 1,089 Français.

Il ne faut pas oublier, dans la comparaison avec les tableaux antérieurs, que cinq Instituts antirabiques fonctionnent aujourd'hui qui n'existaient pas autrefois. Lille, Marseille, Montpellier, Lyon et Bordeaux drainent les mordus des régions environnantes.

Aisne	15	Gers	6	Oise	10
Allier	17	Ille-et-Vilaine	24	Orne	15
Alger	1	Isère	1	Puy-de-Dôme	15
Alpes-Maritimes	1	Indre	14	Pyrénées (Hautes-)	3
Ardèche	1	Indre-et-Loire	16	Saône-et-Loire	3
Aveyron	4	Jura	12	Saône (Haute-)	8
Cantal	40	Landes	1	Savoie	3
Calvados	25	Loire (Haute-)	2	Savoie (Haute-)	1
Cher	6	Loire-Inférieure	23	Sèvres (Deux-)	20
Charente	9	Loiret	4	Seine-et-Marne	5
Charente-Inférieure	7	Loir-et-Cher	4	Seine-Inférieure	10
Côte-d'Or	6	Lot	24	Seine-et-Oise	73
Côtes-du-Nord	36	Lot-et-Garonne	3	Seine	386
Corrèze	26	Lozère	1	Somme	14
Creuse	25	Maine-et-Loire	31	Tarn	4
Dordogne	14	Manche	18	Tarn-et-Garonne	5
Doubs	2	Marne	6	Vendée	10
Eure	3	Mayenne	8	Vienne	4
Eure-et-Loir	7	Meurthe-et-Moselle	3	Vienne (Haute-)	19
Finistère	18	Meuse	2	Vosges	1
Gard	1	Morbihan	7	Yonne	1
Garonne (Haute-)	4	Nièvre	1		

PERSONNES PRISES DE RAGE EN COURS DE TRAITEMENT.

Bayols, Rosa, 2 ans, demeurant chez son père à Grazac (Tarn). Mordue le 23 juin, au front, plaie pénétrante oblique de 10 centimètres; paupière supérieure de l'œil gauche, une plaie pénétrante suppure, conjonctivite. Ces plaies n'ont pas été cautérisées.

Mordue par un chien reconnu enragé un vétérinaire de la localité.

La jeune Bayols a commencé le traitement le 24 juin, a été prise de rage le 7 juillet. Morte à l'hôpital Pasteur le 9 juillet.

PERSONNES TRAITÉES, MORTES DE RAGE APRÈS LE TRAITEMENT.

Mme Denechau, née Leroyer, 63 ans, demeurant à Angers. Mordue le 30 juillet, main gauche face dorsale 3 morsures profondes, main droite 4 autres morsures profondes, coude droit 3 morsures pénétrantes, cuisse droite 4 morsures pénétrantes. En tout 14 morsures profondes qui ont saigné et qui ont été lavées seulement au phénol.

Mordue par un chien reconnu suspect de rage par M. Doussart, vétérinaire à Angers. Un cobaye, inoculé avec le bulbe de ce chien le 31 juillet, a été pris de rage le 27 décembre.

Mme Denéchau a été traitée à l'Institut Pasteur du 1er au 20 août; les symptômes rabiques se sont manifestés chez elle le 30 octobre, morte le 2 novembre.

Sept autres personnes mordues gravement par le même chien et traitées à l'Institut Pasteur se portent bien.

Pirce, Jean-Baptiste, 51 ans, coiffeur, rue Muller, 24, à Paris. Mordu le 2 octobre. Index droit, 3 morsures pénétrantes ; pouce droit, 1 morsure pénétrante. Ces plaies qui ont saigné ont été lavées seulement à l'eau.

Mordu par un chien qui a été reconnu enragé par un vétérinaire.

Pirce ne s'est présenté à l'Institut Pasteur que le 11 octobre. Traité du 11 au 28 octobre. Les premiers symptômes rabiques se sont manifestés le 8 février 1903. Mort à l'hôpital Pasteur le 9 février.

Pirce était alcoolique.

RECTIFICATION A LA STATISTIQUE DE L'ANNÉE 1900.

Bowen Thomas, 61 ans, charpentier, demeurant à Glan-Garnant, Galles du Sud, Angleterre. Mordu le 7 août, index et médius gauche, 5 plaies pénétrantes, par un chien reconnu enragé par M. Howell-Ress : les plaies ont été cautérisées au nitrate d'argent.

Bowen a éte traité du 31 août au 17 septembre 1900. Mort de rage le 28 mai 1902.

En tenant compte du cas de Bowen, il faut rectifier la statistique de 1900 de la façon suivante :

Personnes traitées..	1,413
Morts..................................	5
Mortalité..................................	0,35

et le tableau B, morsures aux mains, devient : 555 traités; morts 1.

Sceaux. — Imprimerie Charaire.

Le Gérant : G. Masson.



17me ANNÉE JUIN 1903. N° 6

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

RECHERCHES
SUR LA PHYSIOLOGIE D'UNE ALGUE VERTE

Par M. le Dr P.-G. CHARPENTIER

INTRODUCTION

Une cellule verte, n'est pas obligée, pour vivre et se multiplier, de disloquer une molécule de matière organique plus ou moins complexe, comme le font les autres cellules vivantes; elle doit tout au contraire prendre son carbone au composé qui le renferme sous sa forme la plus dégradée, c'est-à-dire à l'anhydride carbonique. Il existe donc une différence des plus marquées entre la nutrition des plantes vertes et celle de toutes les autres, différence qui, du reste, apparaît plus profonde, à mesure que l'on connaît mieux le rôle du carbone dans les végétaux.

Il est évident que, toutes choses égales d'ailleurs, la plante se développera plus ou moins vite suivant la nature de son aliment carboné, et cette vitesse de multiplication peut déjà servir à apprécier la valeur de cet aliment. C'est sur cette considération que Raulin a fondé la méthode qu'il a suivie dans son travail sur l'Aspergillus niger[1]; mais cette méthode, qui

1. Raulin, Etudes chimiques sur la végétation. *Ann. des Sc. nat.*, 1870.

donne de très bons résultats quand il s'agit de la nutrition minérale, est tout à fait insuffisante dans l'étude de la nutrition carbonée, parce qu'elle ne tient aucun compte de la quantité d'aliment qu'il faut dépenser pour obtenir un poids donné du végétal, et le rapport du poids de plante produit au poids d'aliment consommé, ou le rendement, a, en l'espèce, une très grande importance.

Cette notion du rendement n'étant pas encore suffisamment précise, je la remplacerai par une autre qui l'est beaucoup plus. Ce qu'il serait surtout intéressant de connaître, c'est la quantité de carbone qui est devenue partie intégrante des tissus, ou le carbone *construit*, eu égard à la quantité de carbone mise en œuvre pendant une certaine période de la vie de la plante. Si celle-ci avait la même composition élémentaire que son aliment, il est clair que le nombre mesurant le rendement représenterait en même temps le rapport de ces deux poids de carbone, et servirait par conséquent à apprécier le mode d'utilisation de cet élément. Mais, en général, la composition de la plante et celle de son aliment sont fort différentes, si bien que la valeur du rendement ne permet pas de se faire une idée exacte de la manière dont le carbone est utilisé. On peut y parvenir facilement en déterminant le rapport, dont je viens de parler, du poids du carbone construit au poids total du carbone qui a pénétré dans la plante, rapport que j'appellerai *coefficient d'utilisation du carbone*.

Le poids du carbone D qui est entré dans les cellules du végétal a servi à deux fins : une partie C est construite, l'autre a été dépensée, soit pour fournir à la plante l'énergie dont elle a eu besoin pour faire ses tissus, c'est E_p., soit pour entretenir la vie des cellules déjà formées, c'est E_e. En sorte qu'à chaque instant on peut écrire :

$$D = C + E_p + E_e.$$

La somme $C + E_p$ est ce que M. Duclaux[1] appelle la *dépense de construction*, E_e étant la *dépense d'entretien*. $E_p + E_e$ est le carbone excrété par la plante, que l'on peut désigner par E; l'égalité précédente peut donc s'écrire :

$$D = C + E$$

D'où :
$$\frac{C}{D} = 1 - \frac{E}{D}$$

1. Duclaux, *Traité de microb.* I, p. 197.

Le coefficient d'utilisation du carbone, toujours plus petit que l'unité, s'en écartera d'autant moins que E sera plus petit relativement à D, c'est-à-dire que la quantité de carbone excrétée sera plus faible relativement à celle mise en œuvre, ce qui était évident *à priori*. Il varie comme le rendement, en ayant une signification plus précise.

Ceci posé, il est aisé de comprendre à quel point la vie des plantes vertes diffère de celle de toutes les autres.

Celles-ci prennent exclusivement leur carbone au substratum sur lequel elles reposent, et, si cet élément leur est offert sous la forme préférée, sous celle de sucre, le rendement ne dépasse guère 1/3 ; il faut trois parties de sucre pour faire une partie de plante (là au moins où des mesures exactes ont été faites, comme dans le cas de la levure et de quelques mucédinées[1]). Le coefficient d'utilisation du carbone est alors voisin de 0,40 ; environ 60 0/0 du carbone mis en œuvre ne font que traverser les tissus de la plante et subissent en grande partie une combustion complète, pour produire l'énergie nécessaire aux réactions chimiques dont le protoplasma est le siège. La lumière joue d'ordinaire un rôle très effacé dans la vie de ces végétaux ; elle peut sans inconvénient faire défaut la plus grande partie du temps. J'ajoute qu'en général l'ammoniaque est une excellente source d'azote, sinon la meilleure.

Il en va tout autrement pour les plantes vertes. Elles prennent normalement leur carbone dans l'atmosphère, et le coefficient d'utilisation du carbone a une valeur très élevée; je ne connais aucune expérience qui permette de le calculer exactement; une seule, faite par M. Th. Schlœsing[2] pour établir le bilan du carbone dans le développement de la Houque laineuse, donne à penser que ce coefficient doit être très voisin de l'unité[3], la presque totalité du carbone qui pénètre dans la plante est construite, ce qui se conçoit étant donnée la faible quantité d'anhydride carbonique qu'exhalent les plantes vertes. Celles-ci, ne pouvant se procurer d'énergie en brûlant du carbone, s'en procurent autrement, elles en prennent à la lumière solaire, qui devient

1. Duclaux, *Traité de microb.* I, p. 196.
2. Th. Schlœsing, *Ann. Inst. Past.*, t. VII, 1893, p. 28.
3. Cette expérience ne permet pas une conclusion absolument rigoureuse, parce que la Houque a été cultivée en atmosphère confinée. Je ferai voir plus loin, p. 387, que la vie d'une plante verte à l'air libre ne peut être comparée à celle de la même plante maintenue à l'obscurité qu'avec beaucoup de réserves.



de ce fait absolument nécessaire au fonctionnement régulier de leurs organes.

Je viens de supposer, implicitement il est vrai, que les plantes pourvues de chlorophylle ne peuvent pas prendre de carbone directement aux matières organiques du sol, c'est-à-dire sans qu'il soit gazéifié au préalable. En est-il réellement ainsi? Il ne semble pas que la question ait été posée nettement avant Liebig[1], qui la résolut par la négative; Boussingault conclut dans le même sens, car, dit-il: « J'admets que la totalité du carbone, assimilé par les plantes, a le gaz carbonique pour origine, parce que je ne connais pas une observation assez nette et assez complète pour établir que les matières carbonées renfermées dans le sol, les acides bruns par exemple, leur fournissent directement du carbone[2]. » Plus récemment M. Duclaux[3] a montré que ni les haricots, ni les pois ne pouvaient pendant la germination attaquer la caséine, le lactose, le saccharose ou l'amidon cuit. J. Laurent[4], au contraire, a conclu de cultures faites à la lumière, que le maïs peut prendre par ses racines du carbone au glucose et au sucre interverti, mais les expériences faites en présence de l'anhydride carbonique de l'air manquent de précision. Enfin, suivant M. Mazé[5], le maïs peut à l'obscurité assimiler de faibles quantités de glucose. En somme, dans l'état actuel de la science, on peut dire que si les plantes vertes prennent du carbone aux matières organiques du sol, elles ne le font que difficilement et pour de faibles quantités, à l'état normal bien entendu.

On sait que les végétaux à chlorophylle consomment très aisément l'azote nitrique, tandis qu'ils n'assimilent l'azote ammoniacal que sous certaines réserves[6].

Ainsi, tant au point de vue de la nature de l'aliment carboné et de son utilisation, qu'à celui de la nature de l'aliment azoté et du rôle de la lumière, les plantes vertes diffèrent grandement de toutes les autres. Ce que j'ai rappelé suffit amplement à faire préjuger quelles dissemblances peuvent exister dans le détail des phénomènes vitaux.

1. Liebig, *Chimie appliq. à l'agricult.*
2. Boussingault, *Chim. agric.*, t. IV.
3. Duclaux, *C. R.* 1885, C, p. 66.
4. J. Laurent, *C. R.*, t. CXXVII, p. 786.
5. Mazé, *C. R.* 1899, CXXVIII, p. 185.
6. Mazé, *Ann. Inst. Past.*, t. XIV, 1900, p. 26.

J'ai jusqu'ici exposé les faits tels qu'on les envisage ordinairement; cette manière de voir est-elle légitime? la présence de la chlorophylle entraîne-t-elle nécessairement dans la vie de la plante les changements que j'ai signalés? On connaît déjà des microbes dépourvus de pigment, qui peuvent assimiler le carbone de l'atmosphère; existe-t-il en revanche des végétaux verts capables de consommer le carbone des matières organiques à la manière des mucédinées, sur la vie desquelles, par conséquent, la lumière aurait peu d'influence?

Il est évident d'ailleurs que, possédant de la chlorophylle, ils pourraient, convenablement éclairés, prendre aussi du carbone à l'anhydride carbonique.

En établissant l'existence de telles plantes, je me propose de montrer qu'une des barrières que l'esprit avait élevées, à bon droit semblait-il, entre deux groupes de végétaux n'a pas plus de raison d'être que bien d'autres, qui ont dû tour à tour être renversées. La physiologie se prête encore moins que la morphologie à la classification des êtres.

On connaît, il est vrai, des plantes vertes, qui, exposées à la lumière, sont loin de prendre tout leur carbone à l'atmosphère; M. Bonnier[1] a constaté que chez le gui, le thesium humifusum, et plusieurs genres de scrofularinées, l'assimilation chlorophyllienne est moins active qu'elle le devrait; encore très notable chez le gui et les melampyrums, elle est plus faible dans les rhinanthus et les pédicularis, pour devenir presque nulle dans les euphrasias; mais toutes ces plantes sont parasites et comme telles plus ou moins dégradées, car la fonction chlorophyllienne subit chez elles le même sort que subit dans des cas analogues la chlorophylle elle-même, qui, par exemple, peu abondante dans certaines espèces de rhinanthus, est absente dans l'orobanche.

Tous ces végétaux parasites ne répondent pas au but que je me suis proposé; en forçant un peu les choses on peut dire qu'une plante parasite n'est qu'un membre de son hôte et qu'il est impossible de séparer leurs fonctions, encore moins de conclure, des phénomènes qui s'y déroulent, ceux qui pourraient se passer dans une plante ordinaire.

1. Bonnier, *Comp. Rend.* 1891, CXIII, p. 1074.

Ce sont des plantes normales, vivant d'une vie autonome, que j'ai voulu étudier.

Dans la première partie de ce mémoire, je m'occuperai de la recherche et de la culture du végétal, dans la seconde de sa nutrition carbonée.

Je veux dire ici toute ma gratitude à mes maîtres : M. Duclaux, qui a pris la peine de suivre pas à pas dès l'origine toutes mes expériences, les critiquer et m'encourager sans cesse de ses conseils ; M. Roux, à qui je dois toutes mes connaissances bactériologiques ; M. G. Bonnier qui fut mon maître à la Faculté des Sciences et m'a toujours montré la plus grande bienveillance. M. Schlœsing fils a bien voulu m'initier à ses délicates méthodes d'études des gaz, je ne saurais l'en trop remercier ; M Matruchot en botanique, M. G. Bertrand en chimie m'ont bien souvent donné des avis fort utiles, je leur en reste bien reconnaissant.

PREMIÈRE PARTIE
Généralités sur la plante.

I

RECHERCHE ET ISOLEMENT DE LA PLANTE

La plante cherchée doit satisfaire aux deux *desiderata* suivants :

1° Il faut pouvoir faire avec précision l'histoire de ses relations avec son substratum et avec l'atmosphère, et pour cela éliminer, avec le plus grand soin, pendant la durée de l'expérience, tout phénomène latéral dont le résultat ne peut être exactement mesuré; l'ingérence des infiniment petits, en particulier, doit être scrupuleusement évitée; la plante doit être *cultivée à l'état pur*, bactériologiquement parlant.

2° Il faut que la plante contienne de la chlorophylle et néanmoins vive de préférence comme une mucédinée aux dépens de matières organiques.

C'est parmi les végétaux verts les plus inférieurs, n'ayant pas de tissus bien différenciés, que j'avais le plus de chances de trouver un être chez lequel la chlorophylle ne jouerait pas un rôle capital ; aussi ai-je conduit mes recherches dans le groupe des algues qui forment une couche verte sur le terreau, l'écorce des arbres, m'adressant de préférence aux unicellulaires, qu'il est plus aisé de cultiver à l'état de pureté.

J'ai isolé la plante comme on isole un microbe.

La solution minérale suivante :

Sulfate de magnésium	1	gramme.
Phosphate bipotassique	2	grammes
Nitrate de calcium	2	—
Saccharose	10	—
Eau	1.000	—

solidifiée par la gélose, m'a servi de milieu nutritif, — il faut avoir soin de chauffer séparément la solution saline et une solution de gélose pour éviter la saccharification de celle-ci et la

perte de son pouvoir gélatinisant, que produit le chauffage à 120° en présence du phosphate bipotassique.

J'ai ensemencé en stries des fragments de terre, recouverts d'une couche très abondante d'algues vertes. Au bout de 4 jours ont apparu de petites colonies vert émeraude, contenant à l'état pur les cellules d'une chlorophycée unicellulaire, que je pouvais désormais cultiver purement.

II

MORPHOLOGIE DE LA PLANTE

La plante est constituée par des cellules sphériques isolées les unes des autres; leur membrane est mince, le protoplasma granuleux, le pigment chlorophyllien n'est pas localisé dans des leucites de forme déterminée, il semble imprégner tout le protoplasma.

J'ai observé quelquefois des cellules en train de bourgeonner, mais très exceptionnellement; en général, pour se multiplier, la plante procède autrement. Lorsque la cellule est suffisamment grosse, son protoplasma subit 3 bipartitions successives, se transformant ainsi en 8 sphérules; la cellule prend alors l'aspect d'une mûre; puis la membrane se rompt, mettant en liberté les 8 petites sphères, qui vont peu à peu grossir et devenir elles-mêmes des cellules adultes, qui recommenceront le même cycle de développement. Dans les préparations microscopiques, les coques vides sont très visibles, à cause de leur différence de réfringence avec l'eau; elles sont des plus nettes si la préparation est colorée par les couleurs basiques d'aniline.

Les cellules peuvent encore contenir, dans certaines circonstances, que je préciserai plus tard, de gros grains d'amidon.

Cette plante, que M. Bornet a bien voulu examiner avec une complaisance dont je ne saurais trop le remercier, est identique au *Cystococcus humicola* de Nägeli; elle fait partie du groupe des Confervacées à thalle dissocié, qu'on a réunies sous le nom de Palmellacées.

Beyerinck [1] et Kossowitch [2] ont déjà chacun à leur tour cultivé cette algue à l'état de pureté.

1. Beyerinck, *Bot. Zeit.*, 1890.
2. Kossowitch, *Bot. Zeit.*, 1894.

III

MILIEUX DE CULTURE

Le Cystococcus pousse bien sur le milieu gélosé sur lequel je l'ai isolé; il forme une couche verte, très épaisse, d'aspect chagriné, qui a peu de tendance à s'étendre au delà de la strie d'ensemencement.

Le bouillon de haricots glucosé et gélosé, tel que l'a employé M. Mazé[1], est aussi un très bon milieu de culture pour la plante.

Dans la plupart de mes expériences, j'ai dû, pour apprécier l'abondance de la culture, connaître exactement le poids de plante produit, et pour cela renoncer aux milieux solides, qui se prêtent mal à une semblable détermination, pour avoir recours aux milieux liquides.

La solution indiquée page 375, convient mal pour ces cultures, elle est trop riche en calcium; celui-ci se précipite à l'état amorphe ou cristallisé sous l'influence de la très faible augmentation d'alcalinité que le développement de l'algue amène dans le milieu. Or, avant de peser la récolte, il faudrait éliminer ce phosphate qui est recueilli avec la plante; il est plus simple d'éviter sa formation en employant la solution suivante :

Sulfate de magnésium	1 gramme.
Phosphate bipotassique......................	2 grammes.
Nitrate de potassium...........	2 —
Nitrate de calcium..........................	0gr,05.
Sulfate ferreux.............................	traces
Eau...	1000 grammes.

à laquelle on ajoute du glucose. La réaction de ce dernier milieu est celle du phosphate bipotassique, c'est-à-dire neutre à la phtaléine et à l'orangé et légèrement alcaline à l'alizarine sulfoconjuguée; aussi le chauffage à 120° a-t-il pour effet de précipiter une partie des sels dissous, notamment le fer et le calcium; il en reste néanmoins suffisamment en solution pour satisfaire aux besoins de la plante, parce que la présence du sucre empêche une précipitation totale.

Existe-t-il pour le Cystococcus un meilleur milieu de culture que celui que je viens d'indiquer, ou celui-ci est-il pour

1. Mazé, *Annal. Inst. Past.*, 1897, n° 1.

l'algue ce qu'est le milieu Raulin pour l'Aspergillus? Il est impossible de savoir ce qu'il en est, bien que les cultures obtenues se développent très abondamment et rapidement; tout ce que je puis dire, c'est que dans le milieu en question, la plante pousse assez bien pour permettre de réaliser les expériences que nécessite ce travail.

Dans les milieux liquides, le Cystococcus vit sur le fond du vase, où il forme une couche plus ou moins dense, laissant le liquide surnageant absolument limpide. La récolte est d'autant plus abondante que l'air a un plus large accès auprès des cellulès, et, par suite, que le liquide est réparti en couche plus mince dans les vases de culture.

La plante se multiplie très bien à 28°, la lumière diffuse lui est favorable; les rayons directs du soleil, s'ils ne la tuent pas toujours, lui nuisent beaucoup.

IV

PESÉE DE LA RÉCOLTE

Pour séparer la plante du liquide de culture, on ne peut guère employer la filtration sur papier; les pores du filtre s'obstruent très rapidement, l'opération devient interminable. Il est bien plus avantageux de mettre la culture dans un tube et de la soumettre à l'action de la force centrifuge. Quand la vitesse de rotation est suffisante, l'opération est achevée en quelques minutes, toute la plante est rassemblée au fond du tube, laissant le liquide tout à fait limpide et facile à décanter.

La récolte, mise dans un verre de montre taré, est desséchée dans le vide sec pendant quelques heures et la dessiccation est achevée dans l'étuve à 105°.

L'augmentation de poids du verre de montre donne le poids sec de l'algue avec toute la précision désirable.

DEUXIÈME PARTIE

Assimilation du carbone.

Pour mettre en lumière les caractères saillants de l'assimilation du carbone par le Cystococcus, j'étudierai avec grand soin la vie de l'algue aux dépens du glucose, qui est extrêmement fréquent dans les tissus végétaux, et qui est d'ailleurs un excellent aliment pour toutes les plantes inférieures. Je m'occuperai ensuite de l'assimilation de quelques autres sucres, qui présentera des particularités intéressantes, et permettra de se faire une idée de la synthèse des hydrates de carbone dont la cellule est le siège.

I

ASSIMILATION DU GLUCOSE

Le développement rapide et abondant de la plante dans le milieu dont j'ai indiqué la composition page 377, fait bien pressentir qu'elle assimile le glucose, mais, comme l'accès de l'anhydride carbonique de l'air n'a pas été évité, la conclusion manque de rigueur, il faut recommencer l'expérience dans de nouvelles conditions.

Dans une fiole plate, dite boîte à culture de M. Roux, je mets 100 c. c. de la solution minérale indiquée page 377, additionnée de 1 0/0 de glucose (la couche liquide n'a pas plus de 3 à 4 millimètres d'épaisseur); après stérilisation, la fiole est ensemencée, puis fermée par un bouchon traversé par 2 tubes de verre; pendant toute la durée de la culture, qui se fait à 28°, à la lumière diffuse, un courant d'air complètement dépouillé d'anhydride carbonique passe sur la surface du liquide, entrant par l'un des tubes de verre et sortant par l'autre. Au bout de 11 jours la récolte est très abondante, son poids s'élève à 400 milligrammes, et 642 milligrammes de sucre ont disparu du milieu.

Ainsi, en même temps que ce dernier s'appauvrissait en sucre, la plante se multipliait très rapidement; elle a donc certainement consommé le glucose, dont le carbone doit se trouver partiellement dans les cellules[1].

1. Ce résultat est en opposition avec celui énoncé par Kossowitch dans son mémoire sur la fixation de l'azote (*Bot. Zeit.*. 1894); mais il confirme ceux obtenus 6 ans auparavant par Beyerinck (*Bot. Zeit.*, 1890).

Peut-être eût-il semblé plus naturel, au premier abord, pour s'assurer de l'assimilation effective du glucose, de supprimer la fonction chlorophyllienne en cultivant le Cystococcus à l'obscurité? Si je ne l'ai pas fait, c'est que j'ai tenu, pour établir un point aussi important, à mettre la plante dans les conditions de vie les plus normales. La lumière est aussi indispensable aux végétaux verts que la chaleur et l'humidité; en supprime-t-on l'accès, ceux-ci même nourris de sucre, s'étiolent, leurs tissus se gorgent d'eau [1], ils perdent toute ressemblance avec des végétaux normaux; la fonction chlorophyllienne est totalement supprimée, il est vrai, mais toutes les autres sont ralenties, la réduction des nitrates, par exemple, est très entravée [2]. Une plante verte, maintenue à l'obscurité, est un être malade.

Le Cystococcus obtenu dans l'expérience ci-dessus, à la lumière et aux dépens du glucose, est très vert; les cellules sont en majorité petites, leur membrane est mince; le liquide de culture contient beaucoup de coques vides de vieilles cellules.

L'algue peut prendre son carbone au glucose, mais par quel mécanisme le fait-elle?

Assimile-t-elle ce sucre sans l'aide de sa chlorophylle, c'est-à-dire en en brûlant une partie pour organiser l'autre? le brûle-t-elle au contraire complètement pour ne prendre son carbone qu'à l'anhydride carbonique (la mise en marche se faisant, dans cette hypothèse, au moyen des matières de réserve contenues dans les cellules ensemencées)? ou bien la vie de la plante tient-elle à la fois des deux manières d'être que je viens d'indiquer?

C'est à l'expérience à prononcer.

Le Cystococcus peut se passer de l'aide de sa chlorophylle pour prendre du carbone au glucose.

Pour le prouver, j'ai fait 4 cultures identiques à celles de la page 379, mais 2 d'entre elles étaient exposées à la lumière diffuse et les deux autres maintenues à l'obscurité — les vases de culture étaient entourés de plusieurs enveloppes de papier noir opaque; — un courant d'air purgé d'anhydride carbonique passait constamment sur la surface du liquide des deux premières,

1. MAZÉ, *Comp. rend.* 1899, c. XXVIII, p. 189.
2. PAGNOUL, *Ann. agron.*, 1879, t. V.

précaution naturellement inutile pour les deux autres. Voici les résultats obtenus :

TABLEAU I

Conditions d'éclairement	Durée de la culture en jours	Poids sec de la récolte en mg.
A la lumière	11	400
A l'obscurité	—	27
A la lumière	18	578
A l'obscurité	23	275

Ces chiffres montrent que le Cystococcus peut parfaitement se développer à l'obscurité aux dépens du sucre, c'est-à-dire dans des conditions où sa chlorophylle ne lui peut être d'aucun secours ; la multiplication est lente, il est vrai, puisqu'en 11 jours il ne s'est fait que 27 milligrammes de plante contre 400 produits à la lumière, mais le développement suit une marche régulière qu'attestent les 275 milligrammes de plante récoltés en 3 semaines à l'obscurité. Je ferai cependant remarquer que les cellules qui n'ont pas subi l'influence des rayons lumineux contiennent beaucoup de substances de réserve, qui, n'étant pas organisées, ne devraient pas compter dans le poids de la récolte; les chiffres obtenus pour les cultures faites à l'obscurité sont donc en réalité trop forts, mais ils indiquent le sens du phénomène, c'est tout ce que nous pouvons leur demander pour le moment; je reviendrai du reste plus loin sur cette question.

Le Cystococcus peut, grâce à sa chlorophylle, prendre du carbone à l'anhydride carbonique.

Ceci ressort de l'étude de la marche de 2 cultures faites en atmosphère confinée, l'une à la lumière, l'autre à l'obscurité.

Expérience I (à la lumière). — Dans un ballon à fond plat, suffisamment résistant pour que l'on puisse y faire le vide, je mets 50 c. c. de liquide de culture. Après stérilisation à 120°, le ballon est ensemencé; il est ensuite fermé par un bouchon de caoutchouc traversé par l'extrémité inférieure d'un tube de verre dont l'autre extrémité est munie d'un bout de caoutchouc à vide fermé lui-même par un morceau de baguette de verre. Le bouchon

en caoutchouc d'une part, le morceau de tube en caoutchouc de l'autre sont chacun noyés sous le mercure d'après le procédé indiqué par M. Schlœsing[1] pour éviter les fuites. Un tampon de coton mis dans le goulot du ballon, au-dessous du bouchon, empêche la pénétration des germes étrangers. Avant de mettre la culture en train il faut retirer avec la pompe à mercure un peu d'air du ballon, afin que la force élastique à l'intérieur soit inférieure à celle de l'atmosphère de 10 centimètres environ; cette diminution de pression est indispensable pour que les joints noyés sous le mercure assurent efficacement l'étanchéité de l'appareil. Cette extraction d'air et toutes les opérations effectuées sur les gaz du ballon sont faites suivant le mode opératoire indiqué par M. Schlœsing. Le ballon est enfin mis dans une serre dont la température est autant que possible maintenue aux environs de 28°.

Au bout de 25 jours le ballon est retiré de la serre, la récolte pèse 223 milligrammes, le liquide de culture ne contient plus trace de sucre. J'extrais complètement les gaz contenus dans le ballon, en le chauffant au bain-marie à 52°, et je les recueille dans le volumètre Schlœsing afin d'en mesurer le volume.

Voici les données numériques qui permettent de calculer ce volume :

H_0 hauteur barométrique ramenée à 0°...........		758mm,2
h_0 différence des niveaux du mercure à 17°7 dans les 2 branches du volumètre, ramenée à 0° = 423,7 — 1,3	422mm,4	
F_0 tension de la vapeur d'eau dans le gaz mesuré à 17°4	14, 79	
$h_0 + F_0$ =	437, 2	437, 2
$H_0 - (h_0 + F_0)$ pression ramenée à 0°		321, 0

Capacité du volumètre = 1949,5 c.c.

D'où, en employant la formule connue, on tire le volume V du gaz supposé sec à 0° et sous 760 millimètres.

$$V = 774,1 \text{c. c.}$$

Une analyse eudiométrique permet de connaître la composition du mélange gazeux.

En désignant par :

H, la hauteur barométrique ramenée à 0°;

h, la différence des niveaux du mercure dans les 2 branches de l'eudiomètre;

1. TH. SCHLŒSING, *Ann. Inst. Past.*, 1892.

θ, la température du mercure dans les 2 branches de l'eudiomètre;

t, la température du gaz en expérience;

F, la tension maxima de la vapeur d'eau à t^o;

le tableau suivant résume les données de l'expérience :

TABLEAU II

	H	h	θ	h ramenée à 0°	t	F	H — (h + F) ramenée à 0°
Gaz à analyser	758,6	478,1	17°3	476,7	17°2	14,60	267,3
après l'action de la potasse	758,6	502,1	17°5	500,6	17°2	14,60	243,4
après l'addition d'hydrogène	758,6	251,5	17°5	250,7	17°3	14,70	493,1
après le passage de l'étincelle	758,7	398,8	17°6	397,6	17°4	14,79	346,3

Les proportions pour 100 d'anhydride carbonique et d'oxygène dans le mélange sont donc les suivantes :

$$\text{Anhydride carbonique } \frac{267,3 - 243,4}{267,3} 100 = 8,9$$

$$\text{Oxygène } \frac{1}{3} \frac{493,1 - 346,3}{267,3} 100 = 18,3$$

Je me suis en outre assuré, en ajoutant du gaz tonnant au gaz à analyser et en faisant passer l'étincelle, que le volume du gaz en expérience ne change pas; le mélange ne contient donc pas de gaz combustible susceptible d'être brûlé par l'oxygène, et en particulier pas d'oxyde de carbone, le passage de l'étincelle ne déterminant pas la production d'anhydride carbonique. Le mélange gazeux est donc constitué exclusivement par de l'azote, de l'oxygène et de l'anhydride carbonique dans la proportion suivante :

CO^2	8,9
O	18,3
Az	72,8
	100,0

Les 774,1 c. c. de gaz extraits du ballon ont donc la composition suivante :

CO^2	68,9 c. c.
O	141,7
Az	563,5
	774,1

Si l'on admet, ce que j'ai du reste démontré dans un précédent mémoire[1], que l'azote de l'atmosphère n'a pu être touché par la plante, et qu'il se retrouve à la fin de la culture tel qu'il était au début, le calcul montre que le ballon contenait, au moment où il a été mis dans la serre, 713,3 c. c. de gaz supposé mesuré sec et sous 760 millimètres de pression.

La plante en se développant a donc amené dans la composition du ballon des changements que résume le tableau III (dans lequel tous les nombres représentent des cent. cub.).

TABLEAU III.

	Début de la culture	Fin de la culture	Gains
CO^2	0	68, 9	68, 9
O	149, 8	141, 7	—8, 1
Az	563, 5	563, 5	0
Totaux...	713, 1	774, 1	60, 8

Expérience II (à l'obscurité). — Elle est conduite comme la précédente, mais le ballon de culture est complètement enveloppé de papier noir opaque. Au bout de 33 jours j'ai obtenu une récolte de 124 mgs. Les gaz contenus dans le ballon en ont été extraits, j'en ai mesuré le volume et déterminé la composition comme dans l'expérience précédente. Le tableau IV résume les changements que la culture a amenés dans l'atmosphère du ballon, (tous les nombres du tableau représentent des c. c.).

Les résultats des 2 expériences sont intéressants à plus d'un titre.

Tout d'abord il y a lieu d'être frappé d'un fait tout à fait imprévu que révèle l'expérience I. A l'inverse de ce que l'on pouvait croire, de ce qui se passe normalement chez les plantes vertes, le Cystococcus, vivant à la lumière, enrichit son atmosphère en anhydride carbonique et non en oxygène; il est vrai

1. P. G. CHARPENTIER. *Annales de l'Institut Pasteur*, mai 1903.

TABLEAU IV.

	Début de la culture	Fin de la culture	Gains
CO^2	0	74, 2	74, 2
O	166	116, 6	— 49,4
Az	624, 8	624, 8	0
Totaux...	790, 8	815, 6	24, 8

qu'il assimile alors le carbone du glucose et non celui de CO^2, mais ceci prouve simplement qu'il se comporte en apparence comme une mucédinée. Je puis même ajouter qu'il ne consomme pas l'anhydride carbonique dès qu'il est produit, puisqu'il le laisse se dégager, et préfère par conséquent prendre son carbone au glucose plutôt qu'à ce gaz.

La grande quantité d'anhydride carbonique dégagée dans l'expérience I prouve l'intensité de la respiration pendant la culture et correspond bien à la grande quantité de glucose consommée, soit 505 milligrammes [1] (il ne faut cependant pas perdre de vue que dans une atmosphère aussi riche en CO^2, le Cystococcus a pu fabriquer de l'alcool aux dépens du sucre; une partie du gaz carbonique recueilli pourrait donc devoir son origine à cette fermentation); or il est manifeste que les 8,1 c. c. d'oxygène qui ont disparu de l'atmosphère du ballon n'ont pu suffire à de semblables combustions respiratoires, ni à l'édification de 223 mgs. de plante; il a fallu que l'oxygène soit consommé en beaucoup plus grande quantité; c'est du reste ce que prouve l'expérience II, dans laquelle ne se faisaient que 124 mgs. de plante tandis que 49,4 c. c. d'oxygène disparaissaient. Donc, dans

1. On ne peut doser les sucres réducteurs dans les liquides de culture par simple décoloration de la liqueur de Fehling, parce qu'il est impossible de saisir le moment exact où tout le cuivre est précipité : aussi ai-je toujours eu recours à la méthode de Lehmann, telle qu'elle a été modifiée par M. Maquenne. (*Bull. de la Soc. Chim.*, 1898, XIX.) Je rappelle qu'elle consiste à faire bouillir avec une quantité connue de liqueur de Fehling une quantité de liqueur sucrée insuffisante pour réduire la totalité du réactif; le cuivre non précipité est dosé par l'iode qu'il peut mettre en liberté dans une solution d'iodure de potassium, cet iode libre étant lui-même dosé par l'hyposulfite de soude.

l'expérience I, la plante a certainement dégagé de l'oxygène; ceci était d'ailleurs encore plus net dans une autre expérience tout à fait analogue, dans laquelle le ballon renfermait à la fin de la culture plus d'oxygène qu'au début.

L'algue a donc, sans aucun doute, décomposé par sa fonction chlorophyllienne une partie de l'anhydride carbonique produit par la respiration.

Au point où nous en sommes arrivés, nous sommes à même de dire que le Cystococcus peut d'une part consommer le glucose sans l'aide de sa chlorophylle, et d'une autre prendre, grâce à elle, du carbone à l'anhydride carbonique.

Le Cystococcus est donc bien la plante que je cherchais, elle est verte et cependant consomme le glucose comme une mucédinée; elle peut, il est vrai, assimiler le carbone de CO^2, mais cet aliment est loin de valoir le sucre pour elle.

La manière dont elle sait utiliser le glucose montre avec une grande évidence qu'elle est intermédiaire entre les plantes dépourvues de chlorophylle et celles qui en possèdent, tout en étant plus rapprochée des premières.

Des faits d'un autre ordre vont légitimer cette manière d'envisager les choses.

Rendement et coefficient d'utilisation du carbone.

J'ai expliqué dans l'introduction ce qu'il fallait entendre par le rendement d'une culture et le coefficient d'utilisation du carbone d'un aliment. Je crois cependant utile de revenir sur ces notions pour les considérer cette fois au point de vue de la plante qui nous occupe.

Je suppose d'abord que celle-ci vive sur un substratum contenant du carbone, dans une atmosphère dépouillée d'anhydride carbonique avant la mise en marche de la culture — ces conditions sont presque exactement celles dans lesquelles je mettrai le Cystococcus. — J'ai montré que, pour toute plante, entre le carbone absorbé, le carbone construit et le carbone excrété, il y avait la relation :

$$D = C + E$$

Le carbone construit C, qu'il provienne directement du substratum, ou indirectement par décomposition de l'anhydride

carbonique dû à la respiration, vient en fin de compte intégralement du carbone D.

Quant au carbone excrété, sous quelle forme se trouve-t-il? Existe-t-il dans le liquide de culture un ou plusieurs produits microbiens désormais inutiles à la plante? Il est impossible de le savoir, l'examen même le plus minutieux du liquide ne le saurait révéler, les coques vides des vieilles cellules du Cystococcus pouvant en se macérant enrichir le liquide en carbone; carbone qu'on ne devrait évidemment pas compter comme carbone excrété.

Dans le doute, j'envisagerai le cas le plus général, celui où le carbone excrété se trouve partie à l'état d'anhydride carbonique et par suite assimilable grâce à la chlorophylle, partie dans des produits organiques désormais inassimilables; en désignant par A le premier et I le second, je puis écrire :

$$E = A + I$$

L'égalité $D = C + E$ devient alors :

$$D = C + A + I.$$

Ici les conditions de vie vont jouer un rôle très considérable. La plante est-elle cultivée dans un courant d'air entraînant à chaque instant l'anhydride carbonique produit? Le carbone A est perdu pour la plante en presque totalité (est seule utilisée la petite fraction prise à l'anhydride carbonique avant sa sortie des cellules); dans ces conditions la vie du végétal se rapproche beaucoup de celle d'une plante sans chlorophylle.

Si au contraire la plante se développe dans une atmosphère confinée, rien n'empêche que tout le carbone A vienne petit à petit à faire partie intégrante de la cellule. Dans les mêmes conditions, mais en supposant la plante maintenue à l'obscurité, tout le carbone $A + I$ serait évidemment inassimilable.

Les conditions de culture, jouant un très grand rôle dans l'utilisation de la matière alimentaire, influeront beaucoup sur la valeur du rendement et sur celle du coefficient d'utilisation du carbone. Celles-ci, toujours inférieures à l'unité, seront d'autant plus grandes que l'aération de la culture sera moins complète.

Si donc la plante vit à l'air libre et à la lumière, le poids de plante produit aux dépens d'un poids donné de carbone sera déterminé uniquement par les conditions d'aération, le rendement et le coefficient d'utilisation du carbone ayant dans ce cas

une valeur bien déterminée; s'il s'agit au contraire d'une culture en atmosphère confinée, au bout d'un temps suffisamment long presque tout le carbone de l'aliment fera partie des tissus de la plante, le rendement et à plus forte raison le coefficient d'utilisation du carbone n'auront plus alors aucun sens.

On conçoit du reste qu'entre ces deux extrêmes tous les intermédiaires puissent trouver place : je montrerai d'ailleurs que si une vie purement aérobie est impossible à procurer à une plante même verte, vivant sous une couche liquide en brûlant de la matière organique, par contre une telle plante maintenue dans une atmosphère confinée peut, dans la première partie de son existence, être considérée comme ayant à sa disposition tout l'oxygène qui lui est nécessaire.

Le rendement d'une culture, le coefficient d'utilisation du carbone d'une substance, n'ont, nous venons de le voir, aucune signification par eux-mêmes, quand il s'agit d'une plante verte; ils n'en prennent une que quand les conditions dans lesquelles on les détermine sont bien précisées; mais, même alors, ce n'est pas la valeur absolue des nombres qu'il faut considérer, parce qu'elle n'a aucun sens, mais leur valeur relative. C'est la comparaison des chiffres obtenus dans 2 cultures dont toutes les conditions sont identiques sauf une, qui peut nous apprendre quelque chose de nouveau.

Pour calculer le rendement d'une culture faite sur glucose, je me suis placé dans les conditions suivantes : j'ai mis 100 c. c. de liquide nutritif dans une boîte de M. Roux ; je l'ai ensemencé puis mis à l'étuve à la lumière diffuse et à une température de 28°. Dans ces conditions d'aération (déterminées par l'épaisseur de la couche liquide dans le vase de culture), de lumière et de température, j'ai au bout de 13 jours recueilli 490 milligrammes de plante, tandis que 914 milligrammes de sucre avaient disparu. Le rendement a donc été :

$$R = \frac{490}{914} = 0,54.$$

Ce nombre dépasse 1/2; or, dans les cultures de levure ou d'aspergillus faites dans les conditions les plus favorables, le rendement est toujours voisin de 1/3, il est donc notablement plus considérable dans le cas du Cystococcus — dans certaines cultures il s'est même élevé jusqu'à 2/3.

Quant au coefficient d'utilisation du carbone, il est facile de le calculer sachant que le glucose contient 40 0/0 de son poids de carbone et la plante 49 0/0, ainsi que je l'ai reconnu par l'analyse élémentaire; ce coefficient Q a la valeur suivante :

$$Q = 0,65.$$

Ce nombre est notablement inférieur à l'unité; il ne faut pas s'en étonner, cela tient à ce que le glucose favorise beaucoup la multiplication du végétal. En effet, si, en consommant un aliment donné, le Cystococcus ne se développe pas rapidement, toutes les fonctions de la vie, la respiration entre autres, sont peu actives, l'anhydride carbonique n'étant produit que lentement peut être presque intégralement repris par la fonction chlorophyllienne au fur et à mesure de sa production; dans ce cas, tout le carbone de l'aliment se retrouve, ou à très peu près, dans les tissus de la plante, et le coefficient d'utilisation du car bone ne diffère que fort peu de l'unité. La conclusion inverse s'impose, si l'aliment convient bien à la vie des cellules; c'est ce qui se passe pour le glucose.

Le nombre 0,65, trouvé pour le Cystococcus, est très notablement plus élevé que celui de 0,40, que j'ai indiqué page 371, comme caractérisant les cultures des plantes sans chlorophylle, mais il est moindre que ceux, très voisins de l'unité, que l'on observe dans le développement des plantes supérieures.

Nous sommes donc amené, à conclure encore que le Cystococcus est une plante verte qui tient le milieu entre les végétaux pourvus de chlorophylle et ceux qui n'en ont pas.

J'ai montré que l'algue pouvait prendre son carbone au glucose directement en le brûlant comme une mucédinée, et indirectement en décomposant l'anhydride carbonique produit par la respiration; elle a en somme deux sources de carbone, là où une mucédinée n'en a qu'une. Il est donc tout naturel de voir dans la présence de la chlorophylle une des raisons pour lesquelles le rendement, le coefficient d'utilisation du carbone atteignent des valeurs si élevées; nous en trouverons une autre en étudiant le rôle de la lumière dans la vie de la plante.

Amylogénèse.

Les cellules développées à l'air libre et à la lumière, traitées

par l'iode, ne présentent aucun corpuscule coloré en bleu foncé, elles ne contiennent donc pas d'amidon [1], elles prennent cependant une très légère teinte bleue uniforme qui parfois tire sur le violet. En faut-il conclure que la cellule, sans contenir d'amidon concrété en grains, renferme cependant des dérivés de l'amidon, amidon soluble, dextrine, etc...? Je ne l'oserais pas, si d'autres expériences ne devaient m'en donner plus loin des preuves plus positives que ces légères colorations.

Ce qu'il est permis d'affirmer, c'est que, vivant en milieu liquide à la lumière, aux dépens du glucose, la plante ne fabrique pas de grains d'amidon; ses cellules sont cependant capables d'en faire, tout dépend des circonstances dans lesquelles elles se trouvent comme nous le verrons.

Influence de l'oxygène de l'air.

J'ai déjà dit (p. 378) que, pour obtenir une récolte abondante, le liquide nutritif devait être en couche mince dans les vases de culture. Il peut au premier abord paraître surprenant que la question d'aération puisse jouer un rôle dans la culture d'une plante verte, que l'on serait en droit de supposer dégageant de l'oxygène à la lumière comme toutes les autres plantes chlorophylliennes. Mais j'ai fait voir que le Cystococcus ne se comportait pas comme une plante verte ordinaire, et, en précisant les rapports de l'algue avec l'atmosphère ambiante, j'apporterai de nouvelles preuves à l'appui de ce que j'ai avancé.

Pour cela le mieux est d'étudier la marche d'une culture en atmosphère confinée.

A quelque moment que j'aie arrêté une telle culture, je n'ai jamais trouvé dans le mélange gazeux extrait du ballon plus de 9 0/0 d'anhydride carbonique ; cela tient à ce que la plante ne pousse pas à la surface du liquide et que l'anhydride carbonique est beaucoup plus soluble dans l'eau que l'oxygène.

Dans l'expérience citée p. 381, la composition de l'atmosphère du ballon était à la fin de la culture la suivante :

1. Pour rechercher l'amidon dans les cellules, voici la méthode que j'ai suivie : la préparation fixée sur lame est traitée par une solution aqueuse de chloral (hydrate de chloral 5, eau 2) (Detmer), qui dissout la chlorophylle : le chloral est ensuite enlevé par l'alcool absolu, puis celui-ci par l'eau; la préparation est alors traitée par la solution iodo-iodurée de Gram, puis lavée à l'eau; s'il y a surcoloration jaune des tissus, un lavage à l'alcool, suivi d'un lavage à l'eau, la fait disparaître.

CO^2	8,9
O	18,3
Az	72,8
	100,0

Connaissant les coefficients de solubilité des 3 gaz dans l'eau, il est aisé d'en déduire en quelle proportion chacun d'eux est dissous dans le liquide de culture ; le calcul donne les nombres qui suivent :

CO^2	86,35
O	5,85
Az	7,8
	100,00

Or, au début de la culture, les quantités des gaz dissous étaient fort différentes :

CO^2	2
O	32,5
Az	65,5
	100,0

Le liquide contenait alors beaucoup d'oxygène et peu d'anhydride carbonique ; la plante en vivant et se multipliant l'enrichit en gaz carbonique en même temps qu'elle l'appauvrit en oxygène.

La plante se tient sur le fond du vase, c'est-à-dire au-dessous de la couche liquide, elle ne peut donc prendre d'oxygène qu'aux gaz dissous (l'oxygène des sels ne pouvant évidemment jouer qu'un rôle fort effacé), elle n'en a donc que fort peu à sa disposition à la fin de la culture. L'atmosphère du ballon ne contient jamais plus de 9 0/0 d'anhydride carbonique, parce que dans ces conditions l'algue ne trouve plus assez d'oxygène pour brûler le glucose, et doit régler la consommation du sucre sur la quantité de gaz qu'elle dégage par sa fonction chlorophyllienne.

Il est donc légitime de supposer que le mode de nutrition du Cystococcus en atmosphère confinée subit avec le temps des changements profonds.

Au début, l'oxygène étant abondant, l'algue consomme très activement le glucose ; sa fonction chlorophyllienne ne lui permet alors de décomposer qu'une très minime fraction de l'anhydride carbonique produit, le reste se dégage et s'accumule peu à peu dans l'atmosphère. Le moment vient bientôt où, cette atmosphère renfermant 8 à 9 0/0 de gaz carbonique, la plante manque d'oxygène : elle en met alors en liberté d'une manière

active et l'emploie à brûler le glucose restant; pendant toute cette période, le taux d'anhydride carbonique se maintient à peu près constant dans le ballon. Enfin le liquide ne contient plus de glucose, le Cystococcus n'a qu'une ressource, c'est de décomposer le reste de l'anhydride carbonique qu'il a dégagé. J'ai constaté que les choses se passaient effectivement ainsi; à la fin d'une expérience qui a duré 7 semaines, l'atmosphère du ballon ne renfermait plus que 0,6 0/0 de gaz carbonique.

L'algue se comporte donc comme une mucédinée, ou bien peu s'en faut, au commencement de la culture, et comme une plante verte à la fin; elle passe insensiblement d'un de ces deux modes de vie à l'autre. L'étude de son développement en atmosphère confinée fait donc ressortir de la façon la plus nette ses caractères d'être de transition.

Il est possible de concevoir maintenant quelle avidité doit avoir pour l'oxygène la plante nourrie de sucre; ni le glucose, ni les sels minéraux, ni l'eau, ne lui en peuvent fournir une quantité suffisante, l'atmosphère seule le peut, une expérience va le prouver.

Je fais 2 cultures simultanées, chacune dans 100 c. c. de liquide, l'une dans un vase à fond plat très large, où le liquide est en très faible épaisseur, l'autre dans un petit ballon complètement rempli; le vase à fond plat est constamment traversé par un lent courant d'air, dépouillé par la potasse de toute trace d'anhydride carbonique. Au bout de 11 jours, j'ai recueilli 400 milligrammes de plante dans la première culture et seulement 55 dans la seconde. L'influence de l'aération est indéniable.

Dans le ballon complètement rempli la culture se continue très lente, jusqu'à complet épuisement du sucre; l'anhydride carbonique, produit en très petite quantité à la fois, est en grande partie repris par la fonction chlorophyllienne, aussi le rendement est-il très bon; il peut atteindre au début 75 0/0 du poids du sucre disparu; il devient par la suite de moins en moins élevé, parce que, comme nous le verrons plus loin, le glucose disparaît sous forme d'alcool et d'anhydride carbonique, tandis que le poids de la plante reste stationnaire.

De tous les faits que je viens d'établir, il résulte :

1° Que, pour obtenir une récolte abondante, il faut mettre le

liquide en couche mince dans le vase de culture, ainsi que je l'ai avancé p. 378.

2° Que la plante préfère le glucose à l'anhydride carbonique comme source de glucose, ce qui n'est qu'une nouvelle confirmation d'une chose déjà établie, page 385.

Influence de l'éclairement.

1° *Production de chlorophylle à l'obscurité.* — Si, à beaucoup de points de vue, les cellules maintenues à l'obscurité diffèrent de celles qui ont été exposées à la lumière, elles leur ressemblent par leur couleur. Le Cystococcus, en effet, n'a pas besoin, comme les végétaux supérieurs, de radiations lumineuses pour faire de la chlorophylle.

Ce fait très intéressant n'est pas neuf dans la science. Je rappelle d'abord, pour mémoire, que les pousses étiolées de conifères, de fougères, de gui, peuvent verdir dans l'obscurité absolue. Mais ce qui est l'exception chez les végétaux supérieurs semble être la règle chez les algues très inférieures.

Bouilhac[1] a montré le premier que le nostoc punctiforme, cultivé à 30° dans des liquides glucosés, était capable de faire de la chlorophylle, quand on le maintenait à l'obscurité.

Artari[2] a pu observer la même chose sur les gonidies de lichens (*chroococcum*, *xanthorica*).

Radais[3] a cultivé à l'état de pureté la *chlorella vulgaris* sur de la pomme de terre et de l'extrait de malt gélosé, et a reconnu que les cultures se font aussi bien et sont aussi vertes à l'obscurité qu'à la lumière; le pigment vert est bien de la chlorophylle, le spectre de sa solution alcoolique en possède les bandes d'absorption.

Enfin Matruchot et Molliard[4] ont obtenu des cultures pures de *stichococcus bacillaris*, et constaté que la plante pousse verte à l'obscurité.

J'ai pu observer la même chose sur le Cystococcus, mais la teinte verte de l'algue, développée à l'obscurité, est un peu

1. Bouilhac, *Thèse* de Paris, 1898.
Etard et Bouilhac, *Comp. rend.*, 1898.
2. Artari, *Bull. de la Soc. Imp. des Natur. de Moscou*, 1899, n° 1, p. 39.
3 Radais, *Comp. rend.*, 1900, CXXV, p. 795.
4. Matruchot et Molliard, *Rev. gén. de bot.*, XIV, 1902, p. 193.

jaune et n'a pas l'intensité de coloration de la plante qui a vu la lumière. Il se peut que la présence de grandes quantités d'amidon dans les cellules, qui n'ont pas été éclairées, fasse paraître leur couleur plus pâle; dans un cas comme dans l'autre le pigment est bien de la chlorophylle, je m'en suis assuré par l'analyse spectrale.

Il est clair qu'à l'obscurité la chlorophylle n'est d'aucune utilité à la plante pour l'assimilation du carbone, elle semble n'être qu'un pigment dont l'utilité nous échappe, comme ceux qui existent dans beaucoup de microbes. La production de chlorophylle à l'obscurité conduit à éloigner le Cystococcus des plantes vertes supérieures, pour le rapprocher des mucédinées et autres végétaux sans chlorophylle.

2° *Abondance des récoltes.* — Le Cystococcus se développe beaucoup plus lentement à l'obscurité qu'à la lumière; 2 cultures, faites dans des conditions identiques, mais dont l'une était éclairée et l'autre non, ont donné des récoltes dont les poids étaient entre eux comme 400 et 27. L'absence de lumière, qui retarde la multiplication des cellules, ne l'empêche cependant pas complètement, car en 33 jours, j'ai pu recueillir à l'obscurité 275 milligrammes de plante.

3° *Aspect des cellules et amylogénèse.* — Les cellules, qui sont nées et ont grandi sans voir la lumière, n'ont pas le même aspect que les autres; elles sont beaucoup plus grosses et leur membrane est très épaisse, ce qui leur donne le facies de cellules en vie ralentie.

De plus, et c'est là le point le plus intéressant, elles sont bourrées de gros grains d'amidon parfaitement visibles à un simple examen microscopique sans aucune coloration, et qui après l'action de l'iode se montrent colorés en noir.

Le Cystococcus peut donc aux dépens du glucose fabriquer de l'amidon à l'abri des radiations lumineuses, j'ai montré qu'il ne le faisait pas quand il est éclairé. Au premier abord il semble donc se différencier nettement des plantes supérieures, qui peuvent faire la synthèse de l'amidon soit à la lumière, en prenant du carbone à l'anhydride carbonique, soit à l'obscurité en consommant des hydrates de carbone variés[1].

1. Sachs, Schimper, Bokorny.

Cette différence n'est cependant qu'apparente et ne tient aucunement à la nature des végétaux.

Ce n'est pas la lumière qui empêche les cellules du Cystococcus de fabriquer des grains d'amidon, car si, dans une culture sur gélose, on examine les cellules qui font partie de la couche la plus superficielle d'une épaisse strie d'ensemencement, on est tout surpris d'en trouver un grand nombre renfermant de l'amidon. Il est probable que ces cellules, qui sont les plus éloignées du substratum nutritif, ne reçoivent que peu de matières alimentaires; si elles peuvent trouver du carbone dans l'atmosphère, elles ne sauraient y rencontrer les cendres et surtout l'azote, qui leur sont nécessaires; certains éléments faisant défaut, la multiplication est retardée et le carbone, qui seul continue à affluer dans la plante, est alors mis en réserve.

D'un autre côté on ne peut supposer que l'amidon s'accumule dans les cellules maintenues à l'obscurité, parce que la plante est incapable de l'utiliser sans l'aide de la lumière. Le 12 juin, en effet, je mets en train une culture dans une étuve obscure; le 9 août, la récolte pèse 430 milligrammes; les cellules ont une membrane épaisse et ne contiennent que peu d'amidon; comme au bout de quelques jours seulement les cellules en sont bourrées, il faut que l'amidon disparaisse avec le temps, c'est-à-dire qu'il soit consommé.

En somme, le Cystococcus s'est comporté comme la levure, dont le premier soin dès qu'elle est dans une solution sucrée, est de se faire dans son protoplasma une réserve de glycogène, qu'elle consommera en cas de disette.

Concluons que l'apparition de l'amidon dans les cellules de l'algue n'est pas liée à la présence ou à l'absence des radiations lumineuses, mais qu'elle est le fait des autres conditions de culture.

On sait que des feuilles vertes, dont les pétioles plongent dans des liquides contenant en solution certains hydrates de carbone, font à l'obscurité de l'amidon dans leurs cellules, et d'aucuns, comme Sachs, veulent en inférer que tout le carbone pris à l'atmosphère dans le libre exercice de la fonction chlorophyllienne doit passer par l'état d'amidon, avant d'être définitivement assimilé. Il est manifeste que tel n'est pas le cas du Cystococcus, l'amidon n'est qu'une forme de réserve du car-

bone, la plante peut se multiplier sans qu'il s'en produise dans les cellules.

4° *Rendement.* — J'ai fait des cultures comparatives à la umière et à l'obscurité dans des boîtes de M. Roux. Comme, d'après ce que nous avons vu jusqu'ici, l'anhydride carbonique de l'atmosphère ne joue, vu sa quantité, qu'un rôle absolument négligeable vis-à-vis de celui qui est produit par la respiration, je n'ai pas dépouillé d'anhydride carbonique l'air qui arrivait sur les cultures ; les vases étaient simplement fermés par un tampon de coton.

J'ai déjà dit que les cellules développées à l'obscurité sont très riches en grains d'amidon, or cet amidon n'est pas de la matière vivante, il n'est qu'une substance de réserve, ne différant du glucose ambiant que par sa plus grande condensation. Pour obtenir le rendement réel dans ces cultures, il faudra retrancher du poids de la récolte le poids de cet amidon ; on connaîtra facilement celui-ci en déterminant la teneur pour 100 en substances saccharifiables de la plante venue à la lumière et de celle venue à l'obscurité, en retranchant le premier nombre du second et en calculant la différence en amidon. Ces saccharifications ont été effectuées en chauffant la plante dans une solution aqueuse d'acide sulfurique à 2 0/0 pendant un quart d'heure à 120°[1].

Les résultats d'une expérience sont consignés dans le tableau V.

TABLEAU V

Numéros des expériences.	Conditions d'éclairement.	Durée en jours.	Poids de la récolte en mgr.	Glucose consommé en mgr.	Substances saccharifiables 0/0.	Amidon 0/0.	RENDEMENT apparent.	RENDEMENT réel.
1	Obscurité.	13	40	80	59	13.2	0,50	0,43
2	Lumière.	—	490	914	44,3		0,53	0.53

Je ferai d'abord observer que les cellules développées à la lumière contiennent 44,3 0/0 de leur poids de matières réductrices. Ce nombre est très grand comparé à celui que donne la levure, qui, gorgée de glycogène, n'en renferme que 32,5 0/0

1. MAZÉ, *Ann. Inst. Past.*, 1902, p. 369.

d'après Laurent[1]. Les chiffres élevés trouvés pour le Cystococcus tiennent probablement à la présence dans les cellules d'hydrates de carbone, qui ne sont pas arrivés à l'état d'amidon, mais que l'acide sulfurique saccharifie. Il est aussi fort possible que sous l'action de l'acide, la cellulose se saccharifie partiellement, car on sait qu' « en traitant la levure par un acide pour transformer le glycogène en sucre, on risque de saccharifier aussi les portions les plus labiles de sa paroi cellulosique, qui semble, du reste, procéder du glycogène par des transitions insensibles[2]. »

Quoi qu'il en soit de l'origine des matières saccharifiables dans les récoltes du Cystococcus, elles existent, et j'ai dû me demander si, dans tous les calculs de rendement que j'ai faits, je n'aurais pas dû en tenir compte. Je ne le pense pas; voulant comparer mes résultats avec ceux obtenus par d'autres pour la levure et l'aspergillus, j'ai dû me mettre dans les mêmes conditions qu'eux; or, pour calculer le rendement dans des cultures de levure ou d'aspergillus, on n'a jamais déduit du poids de la récolte le poids des matières saccharifiables, qui, au moins pour la levure, est considérable, d'après les expériences de Laurent. Je n'avais aucune raison d'agir autrement.

Ceci dit, le tableau V permet de constater que le rendement réel est toujours moins élevé à l'obscurité qu'à la lumière, c'est donc à la lumière et selon toute probabilité à la fonction chlorophyllienne qu'est due la meilleure utilisation de la matière alimentaire, et par suite la valeur élevée du rendement dans les cultures faites sur glucose. Mais dans cette question la chlorophylle ne doit pas être seule mise en cause; dans la culture 1, faite à l'obscurité, le rendement réel est égal à 0,43; il est sensiblement plus grand que celui, 0,33, obtenu dans des cultures de levure ou d'aspergillus effectuées dans des conditions analogues; il semble donc que le protoplasma de l'algue soit organisé pour user avec économie des aliments : il dépenserait moins que celui d'une cellule de levure, par exemple, pour construire autant.

En résumé, il faut conclure que, si d'une manière générale on a raison d'attribuer à la lumière un rôle capital dans la vie des plantes vertes, on a certainement tort de s'imaginer que

1. Laurent, *Ann. Inst. Past.*, 1889, t. III, p. 115.
2. Duclaux, *Traité de microb.*, t. III, p. 223.

toutes les cellules chlorophylliennes en ont également besoin. A ce point de vue, l'étude que nous venons de faire du Cystococcus est particulièrement instructive; il n'est aucune des fonctions que nous avons examinées, même la production de chlorophylle, qui ne se puisse exercer en l'absence des rayons lumineux; la plante peut dans ces conditions effectuer le cycle complet de son développement.

Ici encore l'algue se différencie nettement des plantes vertes plus élevées en organisation.

Production d'alcool.

J'ai dit qu'il était impossible de connaître exactement la quantité de carbone excrétée dans une culture; il est même fort difficile, vu leur très faible quantité, de déterminer seulement la nature des produits d'excrétion ; mais il en est parmi eux un qui mérite de nous arrêter tout spécialement, c'est l'alcool.

Depuis quelque temps on envisage d'une manière toute nouvelle son rôle dans la vie des êtres. La découverte de son existence dans des cellules vertes a puissamment contribué à cette évolution des idées. Comme les faits qui servent de base aux nouvelles hypothèses sont encore peu nombreux, ceux que j'ai pu observer pendant le développement du Cystococcus auront leur intérêt.

Avant de les exposer, je rappellerai très brièvement les expériences qui ont établi que l'alcool pouvait se rencontrer dans les tissus des plantes vertes, mes propres expériences ne faisant que confirmer les résultats déjà obtenus.

1° *Historique.* — Après les grands travaux de Pasteur on n'imaginait pas que l'alcool pût être autre chose que le produit d'un état pathologique des cellules; on croyait que toutes les fois qu'une cellule normalement aérobie se trouve pour une raison quelconque en anaérobiose, ne pouvant prendre d'oxygène à l'atmosphère, elle en prend au sucre en excrétant de l'alcool. C'est à cette conclusion que parvinrent Lechartier et Bellamy[1], Traube[2], Brefeld[3], Müntz[4] et nombre d'autres savants. Cette hypothèse, faisant de l'apparition de l'alcool le

1. Lechartier et Bellamy, *C. R.* LXIX, 1869; LXXX, 1892; et LXXIX, 1874.
2. Traube. *Ber. der. chem. Ges.* 1874.
3. Brefeld, *Landw. Jahrb.* 1876.
4. Muntz, *Ann. de chim. et de phys.* 1876.

corollaire de l'asphyxie des cellules, cadrait parfaitement avec les faits observés chez les plantes dépourvues de chlorophylle; mais, s'il eût été prouvé que des cellules vertes, maintenues à la lumière et par conséquent dégageant de l'oxygène, pouvaient, elles aussi, produire de l'alcool, il eût fallu chercher une autre explication du phénomène ou tout au moins la modifier.

Or il en est réellement ainsi.

En 1882 M. Müntz[1] découvrit de l'alcool dans les tissus de plantes vertes ayant vécu à la lumière dans une atmosphère d'azote. Plus récemment M. Devaux[2] en a trouvé dans des tiges et des branches de plantes ligneuses ayant vécu dans des conditions normales. Mais dans un cas comme dans l'autre on pouvait se demander si la production d'alcool n'était pas la conséquence d'un commencement d'asphyxie des cellules dépourvues de chlorophylle.

M. Berthelot[3] fit faire un pas définitif à la question en établissant l'existence de traces d'alcool dans des feuilles vertes dont la vie avait été des plus normales.

Dès lors on était en droit de se demander, avec M. Duclaux, si cet alcool, qui prend naissance au sein des tissus les plus oxygénés, est réellement un produit d'élimination et s'il ne serait pas plutôt, comme l'amidon et les sucres, une forme transitoire que revêt le carbone avant d'être assimilé.

M. Mazé[4], MM. Godlewsky et Folsening[5] ont récemment fourni des arguments en faveur de cette manière de voir; les sucres subiraient une série de dégradations successives, dont l'aboutissant serait l'alcool; celui-ci serait par oxydation transformé en aldéhyde, que le protoplasma utiliserait directement. L'alcool serait donc en somme pour la plante un aliment; consommé d'ordinaire au fur et à mesure de sa production, il ne s'accumulerait dans les tissus que quand ceux-ci manqueraient d'oxygène pour le brûler. Ainsi s'expliqueraient d'une manière très plausible tous les faits connus jusqu'ici.

Comment cette question de la production de l'alcool se présente-t-elle dans le cas particulier du Cystococcus?

2° *L'algue peut faire de l'alcool.* — Je dirai tout de suite que

1. MUNTZ, *Comp. rend.*, LXXXVI.
2. DEVAUX, *C. R.* 1899.
3. BERTHELOT, *Trav. de la Stat. de Meudon*, 1899.
4. MAZÉ, *Comp. rend.* juin 1899, *et Ann. de l'Inst. Past.* 1902.
5. GODLEWSKY et FOLSENING, *Anzeig. der. Allg. Wochenschr. in Krakau* juillet 1897

j'en ai toujours trouvé dans toutes les cultures que j'ai examinées, quelles que soient les conditions dans lesquelles elles avaient été faites. Mais il n'existe la plupart du temps qu'en si petites quantités qu'il faut le chercher avec soin pour le découvrir.

Voici comment j'ai toujours opéré.

Je distillais le liquide de culture en fractionnant les produits volatils; à cet effet, les vapeurs traversaient le serpentin en verre renversé de Schlœsing; sur ses spires supérieures j'observais les stries que forment en se condensant les liquides de tension superficielle plus faible que l'eau comme l'alcool; puis je recueillais les 10 premiers c. c. qui passent à la distillation, l'expérience m'ayant appris que tout l'alcool du liquide en expérience s'y trouve concentré. Je m'assurais enfin, autant que faire se peut [1], par la réaction de l'iodoforme, que j'étais bien en présence d'alcool, la réaction de la fuschine décolorée par l'acide sulfureux m'ayant prouvé d'autre part que je n'avais pas affaire à de l'aldéhyde.

L'alcool contenu dans les 10 c. c. de liquide recueillis à la distillation était toujours dosé par la méthode de M. Nicloux [2].

3° *Marche de la production de l'alcool et causes qui influent sur elle.* — Mettons en train 3 cultures dans des boîtes de M. Roux, renfermant chacune 100 c. c. de solution nutritive glucosée, et arrêtons-les à des moments différents pour peser les récoltes et doser l'alcool produit; dans le tableau VI sont consignés les résultats que nous obtenons :

TABLEAU VI.

Numéros d'ordre	Durée en jours.	Conditions d'éclairement.	Poids de la récolte en mgr.	Quantité d'alcool en mgr.
1	8	air libre	68	3,5
2	11	id.	297	4,2
3	18	Au bout de 6 jours, le liquide de culture est mis sur une grande épaisseur à la température du laboratoire.	126	12,7

1. On sait qu'il n'existe aucun procédé pour caractériser avec une certitude absolue de petites quantités d'alcool.
2. Nicloux, *Comp. rend. de Soc. de biolog.*, t. III, 1896.

Les cultures 1 et 2 montrent que l'alcool ne s'accumule pas dans le liquide proportionnellement au poids de plante produit.

La culture 3 nous apprend quelque chose de plus; pendant 6 jours elle se fait dans les mêmes conditions que les cultures 1 et 2, mais au bout de ce temps la boîte est relevée et mise sur son petit côté, de manière que le liquide soit en couche épaisse et non plus en couche très mince, puis elle est laissée à la température du laboratoire; l'aération de la plante se fait mal à partir de ce moment et, comme conséquence, la teneur du milieu en alcool s'élève.

Somme toute, dans une culture bien aérée, la quantité d'alcool n'est jamais que très faible; elle ne devient notable que si la plante manque d'oxygène. C'est, toute proportion gardée, ce qui se passe pour la levure. Je dis « toute proportion gardée », parce que je n'ai jamais observé avec le Cystococcus de véritable fermentation, je n'ai jamais vu le moindre dégagement de bulles gazeuses, même dans les cas les plus favorables.

J'ai cependant une fois trouvé beaucoup plus d'alcool, dans un cas où il aurait dû n'y en avoir que très peu, si la question d'aération était seule en jeu; il s'agit d'une culture faite en présence non de 1 0/0 de sucre, mais de 1,7 0/0; j'ai au bout d'un mois recueilli 663 milligrammes de plante et j'ai dosé 51 milligrammes d'alcool dans le milieu. Ce dernier ne renfermait pas assez d'azote et peut-être d'acide phosphorique pour permettre un plus grand développement de la plante, qui, ne pouvant se multiplier, fabriquait de l'anhydride carbonique et de l'alcool qu'elle mettait en liberté. J'ai cité ce fait pour montrer comme tout s'enchaîne dans la vie d'un être et combien il est difficile de préciser les conditions qui régissent l'exercice d'une fonction.

La lumière semble n'avoir aucune influence sur la quantité d'alcool produite. En 58 jours j'ai récolté 430 milligrammes de plante à l'obscurité et le liquide de culture ne contenait que $5^{mgr},8$ d'alcool.

4° *L'alcool est-il un produit intérimaire de la combustion du glucose?* — Si oui, il semble qu'il doive être pour la plante un aliment et doive plus que le glucose en accélérer le développement, comme le sucre interverti accélère plus que le saccharose celui de l'aspergillus.

J'ai essayé de cultiver l'algue dans un milieu renfermant de

l'alcool absolu au lieu de glucose; j'ai toujours échoué. Si parfois, dans des vases de culture maintenus très longtemps à l'étuve, j'ai observé un commencement de développement, il fallait l'attribuer à la présence de l'anhydride carbonique de l'air, dont je n'avais pas, dans ce cas particulier, évité l'accès à la surface du liquide; ces cultures exceptionnelles, et d'ailleurs très pauvres, prouveraient simplement que l'alcool n'est pas aux doses employées un antiseptique pour le Cystococcus.

Pour être alimentaire en effet, l'alcool ne doit peut-être exister dans le milieu qu'en proportion infinitésimale, proportion que l'on dépasse toujours quand on l'ajoute artificiellement au liquide.

Une expérience va du reste nous fixer :

J'ai fait 2 séries de cultures dans les milieux suivants :

1re série. — Cultures en solution minérale glucosée à 1 0/00 et alcoolisée à 1 0/00.

2e série. — Cultures en solution minérale glucosée à 1 0/00.

Au bout de 11 jours j'ai reconnu que les poids des récoltes étaient sensiblement égaux dans les 2 séries. L'alcool n'a pas gêné le développement de la plante, il n'a donc exercé sur elle aucune action antiseptique.

L'expérience enseigne de plus que, même en présence du glucose, il n'a pas été consommé.

Il est fort possible que, par une série de passages dans des milieux contenant à la fois de moins en moins de glucose et de plus en plus d'alcool, je sois parvenu à *habituer* l'algue à se multiplier dans des liquides ne renfermant que de l'alcool comme substance hydrocarbonée; mais un tel résultat eût été sans intérêt, il n'eût pas prouvé que l'alcool est un produit intérimaire de la combustion du sucre, parce que rien ne dit que je n'aurais pu en obtenir un semblable avec d'autres substances; habituer une cellule à un aliment qu'elle ne consomme pas d'ordinaire est un problème qui bien souvent n'est pas insoluble.

Malgré tout, je ne crois pas devoir conclure que le carbone du sucre ne fait pas partie d'une molécule d'alcool avant d'être définitivement assimilé. Il faudrait admettre pour cela que l'alcool est un produit d'élimination inutilisable pour les cellules; or, s'il en était ainsi, l'alcool s'accumulerait dans le milieu proportionnellement au poids de plante, ce qui n'est pas; dans une

culture bien aérée il y en a environ 5 p. 100,000. Il doit donc selon toute probabilité, disparaître à mesure qu'il prend naissance et l'on ne dose jamais que l'excès de ce qui est produit, sur ce qui est consommé.

L'alcool est donc vraisemblablement un des échelons de la série de dislocations que subit la molécule de sucre avant que son carbone soit construit. C'est la seule hypothèse susceptible d'expliquer les faits. Si l'alcool que l'on introduit artificiellement dans un milieu de culture n'est pas consommé, cela peut fort bien tenir à ce qu'il ne se trouve pas du tout dans les conditions de l'alcool produit au sein du protoplasma. On sait que le fait existe pour le glycogène, qui, créé dans la cellule de levure, est consommé avec une très grande facilité, tandis qu'il ne l'est souvent qu'avec beaucoup de peine, quand on le donne comme aliment à la même levure.

5° *Tout le sucre doit-il être transformé en alcool pour être assimilé ?* — Nous avons été conduits à admettre qu'une fraction au moins du sucre absorbé devait prendre la forme d'alcool pour être assimilée ; mais la totalité du sucre doit-elle subir cette transformation?

D'après les expériences de M. Mazé[1], pour que l'alcool soit utilisé par les cellules végétales, il faut qu'elles puissent l'oxyder et pour cela que l'oxygène gazeux leur parvienne très largement. Or il est facile de se rendre compte de l'impossibilité d'une telle oxydation, si l'on suppose le dédoublement par la zymase de la totalité du sucre; à partir d'un certain moment l'oxygène doit fatalement manquer.

Étant donnée une culture faite en atmosphère confinée, il est aisé, connaissant le poids du sucre disparu, d'en déduire les poids d'alcool et d'anhydride carbonique qui ont pu prendre naissance; la composition de l'atmosphère une fois déterminée, on est à même de calculer le poids d'oxygène dont la plante a pu disposer.

Or, dans l'oxydation de l'alcool, le premier composé qui prend naissance, celui qui exige pour se former le moins d'oxygène, est l'aldéhyde.

$$CH^3 - CH^2OH + O = CH^3 - CHO + H^2O$$

La formule permet de calculer le poids d'oxygène nécessaire

1. Mazé, *Ann. Inst. Past.*, 1902, t. XVI.

pour transformer en aldéhyde un poids donné d'alcool. Il est par conséquent facile de s'assurer si l'oxydation, ne fût-ce qu'au premier degré, de tout l'alcool qui a pu se produire a été possible ou non.

Je ferai cependant remarquer qu'en fait les chiffres n'ont pas la signification mathématique qu'ils semblent posséder au premier abord, et cela pour plusieurs raisons :

1° Il existe dans le liquide de culture, à la fin de chaque expérience, une quantité d'alcool que je n'ai pu déterminer; celui-ci s'est en effet vaporisé, quand j'ai extrait les gaz du ballon, et il était impossible de le condenser en totalité dans un réfrigérant même entouré de glace. Cet alcool n'a pas été oxydé; d'où une cause d'erreur dans l'évaluation de la quantité d'oxygène nécessaire pour l'oxydation de l'alcool;

2° Une très légère fraction de l'anhydride carbonique s'est combinée aux bases, qui du fait de la culture ont été mises en liberté dans la solution nutritive;

3° Les matières azotées se sont oxydées.

Ces deux dernières causes d'erreur font que l'oxygène dont la plante a pu disposer ne peut être, lui non plus, évalué d'une manière tout à fait rigoureuse.

Malgré leur imperfection, les nombres que j'ai obtenus sont intéressants.

Le tableau VII résume les résultats de 4 expériences faites en atmosphère confinée, 3 à la lumière et 1 à l'obscurité.

La culture 4 montre qu'en l'absence de lumière $21^{mgr},1$ d'oxygène sur $70^{mg},3$ absorbés, soit les 3/10, ont servi à d'autres oxydations qu'à celles de l'alcool, à celle des matières azotées par exemple; je puis même aller plus loin et affirmer qu'il y a plus des 3/10 qui ont été utilisés de cette façon; dans le cas de cette culture, en effet, qui a duré 33 jours, le ballon contient tellement d'anhydride carbonique que la plante a dû excréter une notable quantité d'alcool dans le milieu, alcool qui, étant resté tel quel, n'a pas été oxydé; le poids d'oxygène exigé par l'oxydation de l'alcool est donc inférieur à $49^{mgr},5$, et par suite le poids d'oxygène employé à d'autres oxydations est supérieur à $21^{mgr},1$.

Bien que ce qui passe dans la vie d'une plante à l'obscurité ne permette pas de conclure rigoureusement ce qui se passerait

TABLEAU VII.

Numéros d'expériences.	Conditions d'éclairement.	Durée en jours.	Glucose disparu.	Le dédoublement par la zymase a pu donner		CO^2 à la fin de l'expérience.	CO^2 décomposé par chloroph.	Oxygène dans CO^2 décomposé	Oxygène en + ou en — dans l'atmosphère.	Oxygène qui a été disponible.	Oxygène nécessaire pour l'oxydation de l'alcool.	Oxygène qui a été en excès ou en défaut.
				Alcool.	CO^2							
1	Lumière.	11	215	124,9	120	32,5	87,5	63,9	+20,6	43,3	43,7	— 0,4
2	Lumière.	17	337	273,9	263,1	125,9	137,2	98,8	+18,5	80,3	95,9	—15,6
3	Lumière.	25	505	257,5	247,1	136	111,4	80,2	—11,6	91,8	90,1	+ 1,7
4	Obscurité.	33	277,5	141,5	135,6	145,9			—70,6	70,6	49,5	+21,1

NOTA. — Tous les nombres du tableau représentent des milligrammes.

à la lumière, on peut certainement admettre que, même dans ce dernier cas, une très notable fraction de l'oxygène absorbé ne se combine pas à l'alcool.

Dès lors il est manifeste que dans les cultures 1 et 2, le Cystococus n'a pu disposer d'une quantité suffisante d'oxygène pour oxyder tout l'alcool produit. Cette conséquence découle moins nettement de l'expérience 3, mais est encore dans ce cas bien vraisemblable, eu égard à la faible quantité d'oxygène qui a pu être en excès en supposant même l'alcool seul oxydé.

Il faut donc qu'une partie du sucre ait été assimilée sans être transformée en alcool.

En résumé, selon toute probabilité, le Cystococcus consomme le sucre, partie en le dédoublant en alcool et anhydride carbonique et partie sans lui faire subir cette transformation, mais par un mécanisme encore inconnu.

Au point de vue de la production de l'alcool, on ne peut dire que l'algue soit une plante de transition entre les plantes vertes et celles qui ne le sont pas, parce que la faculté de faire de l'alcool est générale chez les êtres vivants.

II

ASSIMILATION DU SACCHAROSE

Après l'étude de la consommation du glucose, se place tout naturellement celle du saccharose, dont il dérive généralement dans les tissus végétaux, et dont il dériverait même dans les feuilles, suivant Brown et Morris[1].

Les cultures ont été faites dans la solution minérale indiquée page 377, additionnée de saccharose. Il faut cependant avoir soin de ne pas stériliser ce milieu de culture à l'autoclave, car le sucre de canne chauffé à 120°, en présence de phosphate, s'intervertit partiellement; force est donc d'avoir recours soit à la stérilisation par filtration, soit à la stérilisation séparée d'une solution de saccharose et de la solution minérale.

Le saccharose convient moins bien que le glucose au développement du Cystococcus; en 31 jours de culture je n'ai recueilli que 203 milligrammes de plante. Les cellules étaient pour

1. Brown et Morris, *Jor. of. Chem. Soc.*, 1893.

la plupart petites, leur membrane mince, elles ne contenaient pas d'amidon et ne prenaient pas sous l'action de l'iode la moindre coloration bleue. Il semble donc que l'algue exposée à la lumière ne puisse pas faire d'amidon ni rien d'analogue en prenant son carbone au saccharose.

A quelque moment que l'on examine le liquide de culture, on le trouve sans action sur la liqueur de Fehling; le Cystococcus n'intervertit donc pas le sucre de canne en dehors de ses cellules. Il se comporte probablement comme la *monilia candida*[1] qui ne laisse pas diffuser de sucrase, mais dont le suc cellulaire intervertit le saccharose. En effet, outre qu'il est peu vraisemblable que le saccharose soit assimilé tel quel sans subir d'interversion, il est facile de s'assurer que dans certaines conditions la plante sécrète probablement de la sucrase. Si on la cultive dans un milieu contenant à la fois du saccharose et du glucose; on constate que les deux sucres sont consommés en même temps, car on trouve toujours du sucre réducteur dans le milieu, tandis que le saccharose disparaît peu à peu. L'algue préférant de beaucoup le glucose au saccharose, il faut admettre, ou bien que ce dernier est consommé parce qu'il se trouve en présence de l'autre, ou plutôt que le saccharose s'intervertit au fur et à mesure que la culture progresse.

Ce fait serait en somme de même ordre que ceux qui ont été signalés par MM. Gayon et Dubourg[2] à propos de certaines levures qui, ne laissant diffuser leur sucrase qu'en présence du glucose, n'intervertissent le sucre de canne en dehors de leurs cellules que dans ces conditions.

Le Cystococcus doit donc intervertir le saccharose pour le consommer et il doit assimiler également le dextrose et le lévulose; si en effet l'un des deux était consommé de préférence à l'autre, celui-ci s'accumulerait dans la cellule et y serait immobilisé dans un état insoluble, c'est-à-dire sous forme de grains d'amidon; or il n'en est rien. C'est ce que confirmera du reste l'étude de l'assimilation du sucre interverti.

Dans les cultures sur saccharose le rendement est très élevé En 31 jours, j'ai recueilli 203 milligrammes de plante tandis que 247 milligrammes de saccharose avaient disparu du milieu; le rendement a donc été :

1. Fischer et Lindner, *Ber. der deut. chem. Gesellsch*, t. XXVIII. 1895.
2. Gayon et Dubourg, *C. R.* 1890.

$$R = \frac{203}{247} = 0,82^{(1)}$$

Ce nombre élevé n'a rien qui doive surprendre ; il prouve simplement que l'anhydride carbonique produit par la respiration, a pu être en grande partie décomposé par la fonction chlorophyllienne, et par suite que la culture a dû se faire lentement; nous le savons par ailleurs.

Le calcul donne pour valeur du cofficient d'utilisation du carbone :

$$Q = 0,95.$$

95 0/0 du carbone mis en œuvre sont donc construits, 5 0/0 seulement sont perdus. Ce résultat ne fait que confirmer ce que je viens de dire, à savoir que le saccharose est pour le Cystococcus moins bon aliment que le glucose, mais est bien plus économique que lui.

Maintenue à l'obscurité, la culture sur saccharose ne se fait qu'avec une extrême lenteur; en 34 jours je n'ai recueilli que 5 milligrammes de plante et en 53 jours 10 milligrammes. Nous sommes donc bien loin des cultures faites sur glucose. Les cellules de l'algue sont très vertes, mais, chose remarquable, elles ne contiennent pas d'amidon, quelques-unes cependant prennent une teinte bleue uniforme.

Il me semble difficile de conclure que le Cystococcus est incapable de faire la synthèse de l'amidon en partant du saccharose ; il est probable qu'il ne le peut faire qu'aux dépens du sucre interverti ; or, par suite de la lenteur de la culture, ce dernier ne se fait qu'en très petite quantité à la fois et doit être utilisé, aussitôt produit; c'est ce qui expliquerait qu'il n'y en ait jamais un excès susceptible d'être immobilisé à l'état insoluble.

1. On pourrait m'objecter que, contrairement à ce que j'ai dit page 388, ce rendement n'est pas calculé dans des conditions qui permettent de le comparer à celui que j'ai obtenu pour le glucose, parce que la durée de la culture, de 31 jours dans le premier cas, n'était que de 13 dans le second, et que les milieux renfermaient 2 0/0 de saccharose d'un côté et seulement 1 0/0 de glucose de l'autre. Cela est vrai; mais je ferai remarquer que plus une culture dure longtemps, plus la dépense d'entretien augmente, le rendement a donc une tendance à baisser à mesure que se prolonge le séjour à l'étuve; le nombre 0,82 obtenu au bout de 31 jours est donc plus faible que celui que j'aurais pu calculer au bout de 13 seulement; quant à la richesse en saccharose du liquide de culture, elle ne pourrait influer notablement sur la valeur du rendement que si au bout de 31 jours la plus grande partie du sucre était consommée, or il est bien loin d'en être ainsi. Du reste dans une culture faite en présence de 2 0/0 de glucose, j'ai obtenu un rendement de 0,56 nombre tout à fait comparable à celui, 0,54 calculé page 388.

III

ASSIMILATION DU SUCRE INTERVERTI

Le milieu de culture diffère un peu de celui que j'ai employé jusqu'ici, voici comment il a été préparé :

J'ai interverti du saccharose en le portant à l'ébullition dans de l'eau acidulée par l'acide chlorhydrique ; j'ai neutralisé l'acide par du carbonate de calcium en excès, puis après filtration de l'excès de carbonate, j'ai ajouté à la solution ainsi obtenue de sucre interverti et de chlorure de calcium les sels minéraux nécessaires au développement de la plante. Le milieu avait donc la composition suivante :

Sulfate de magnésium	1 gramme.
Phosphate bipotassique	2 grammes.
Nitrate de potassium	2 —
Chlorure de calcium	0gr,03.
Sulfate ferreux	traces.
Sucre interverti	10 grammes.
Eau	1000 —

Il a été chauffé à 120°, filtré, réparti dans les vases de culture, et enfin stérilisé à 120°.

Le Cystococcus s'y multiplie très rapidement, en 13 jours j'ai récolté 396 milligrammes de plante dans 100 c. c. de liquide.

Le poids de la récolte est tel qu'il est évident *à priori* que le dextrose n'a pas été seul consommé, l'étude du liquide en donne la preuve incontestable.

J'ai déterminé son pouvoir réducteur et son pouvoir rotatoire et j'ai pu ainsi calculer sa teneur en sucre interverti en glucose et en lévulose; voici les nombres obtenus :

Glucose	105 mgr.
Lévulose	62 —
Sucre interverti	167 mgr.

Le lévulose est donc consommé un peu plus vite que le glucose, mais la plante n'a pas pour lui une préférence bien marquée, puisqu'elle assimile en même temps les deux sucres.

Dès lors, il est aisé de prévoir que le rendement doit être très voisin de celui obtenu dans les cultures sur glucose; c'est en effet ce qui arrive :

$$R = \frac{396}{747} = 0,53$$

Il en est de même du cofficient d'utilisation du carbone qui a pour valeur :

$$Q = 0,64.$$

Jusqu'ici la culture sur le sucre interverti ne diffère pas d'une manière sensible, de celle faite sur glucose, mais voici qui va les distinguer.

Un grand nombre de cellules, qui ont vécu aux dépens du sucre interverti, contiennent des grains d'amidon bien nets; très probablement parce que les deux sucres affluent dans l'intérieur des cellules et ne sont pas consommés également vite ; celui qui est en excès s'immobilise sous forme d'amidon.

De l'absence d'amidon dans les cellules nourries de saccharose, j'avais tiré cette conclusion que le Cystococcus devait assimiler également le glucose et le lévulose; c'est précisément ce qui arrive. La plante préfère un peu le second au premier, mais sa préférence n'est pas assez marquée pour qu'elle prenne la peine d'intervertir de nouvelles quantités de saccharose avant de faire disparaître complètement celui des deux sucres qui lui convient le moins.

A l'obscurité, le sucre interverti est assimilé beaucoup plus lentement qu'à la lumière, et les cellules sont très riches en amidon; on devait s'y attendre.

Le tableau VIII résume les résultats d'une expérience :

TABLEAU VIII

Numéro de la culture	Conditions d'éclairement.	Durée en jours.	Poids sec en mgr	Sucre interverti consommé en mgr.	Substances saccharifiables des cellules 0/0	Rendemt.
1	obscurité.	11	433	945	31,3	0,47
2	lumière.	13	396	747	46,6	0,53

Il est intéressant de comparer les nombres de ce tableau avec ceux du tableau V (p. 396).

S'il s'agit du sucre interverti, la teneur de la plante en matières saccharifiables diffère beaucoup moins suivant le mode d'éclairement que s'il s'agit du glucose, la différence étant de 4 7 dans le premier cas, contre 14, 7 dans le second; rien de

surprenant à cela, puisqu'en présence du sucre interverti les cellules éclairées contiennent elles-mêmes de l'amidon.

Dans les deux tableaux, les récoltes nos 2 faites à la lumière contiennent à peu de chose près la même quantité de matières saccharifiables, or les cellules de l'une contiennent de l'amidon concrété en grains, celles de l'autre prennent seulement sous l'action de l'iode une teinte bleue pâle uniforme; on est donc tout naturellement porté à croire que les substances de réserve de ces dernières sont peu différentes de l'amidon solide et sont la cause de la teinte bleue pâle que j'ai observée. Cette supposition que j'avais déjà faite (p. 390) semble recevoir ici une base qui lui manquait.

La récolte 1 sur sucre interverti renferme beaucoup moins de substances saccharifiables que la récolte 1 sur glucose; l'inégale durée des 2 cultures peut expliquer cette différence, car, dès que le milieu ne renferme plus de sucre, ce qui a été le cas de la culture sur sucre interverti, la plante attaque petit à petit ses réserves d'amidon et les fait disparaître.

IV

ASSIMILATION DU LÉVULOSE

Le milieu de culture qui m'a servi est de même que celui que j'ai employé dans l'étude du glucose et du saccharose, ces sucres étant remplacés par du lévulose cristallisé en proportion de 1 0/0.

Le tableau IX résume les résultats obtenus dans une expérience :

Tableau IX

Numéro de la culture.	Durée en jours.	Conditions d'éclairement.	Lévulose consommé en mgr.	Poids sec en mgr.	Rendement.
1	5	Lumière.	141	94	0,66
2	10	—	537	353	0,65
3	12	—	691	413	0,59
4	5	Obscurité.		20	
5	10	—	241	148	0,61

Le lévulose convient très bien au Cystococcus ; les poids des récoltes obtenus à la lumière sont tout à fait comparables à ceux recueillis sur le glucose, mais le rendement est légèrement plus élevé.

Quant au coefficient d'utilisation du carbone, il est :

$$Q = 0,73$$

Les cellules de la plante qui ont vécu à la lumière ne contiennent pas de grains d'amidon.

Le tableau IX montre, ce que j'ai déjà constaté avec les autres sucres, que le rendement baisse à mesure que la durée de la culture se prolonge.

Les récoltes obtenues à l'obscurité, offrent cet intérêt particulier d'être plus abondantes que des récoltes de même âge, obtenues sur glucose; il semble donc que le Cystococcus ait moins besoin de lumière pour assimiler le lévulose que pour assimiler le glucose.

A l'obscurité les cellules de l'algue sont bourrées de grains d'amidon.

V

ASSIMILATION DE L'ANHYDRIDE CARBONIQUE

J'ai déjà fait remarquer que le Cystococcus devait préférer comme aliment le glucose au gaz carbonique; on ne s'expliquerait pas autrement que la plante put dégager de l'anhydride carbonique quand elle consomme du glucose.

D'ailleurs, si dans la solution nutritive, employée dans tout le cours de ce mémoire, on supprime le sucre et qu'on laisse, comme unique source de carbone à la plante, l'anhydride carbonique de l'air, il faut maintenir la culture pendant plusieurs mois à l'étuve pour obtenir une récolte non point abondante, mais seulement appréciable.

On peut, il est vrai, objecter à cette expérience, qu'il y a dans le liquide trop peu de carbone (à cause de la faible proportion du gaz carbonique dans l'air) pour que la plante en trouve à satiété, comme c'est le cas pour les solutions sucrées. Les expériences en atmosphère confinée permettent de répondre à cette objection; nous avons vu qu'en consommant le glucose dans ces conditions, la plante dégage une grande quantité

d'anhydride carbonique et j'ai montré que, quand il n'y a plus assez d'oxygène dissous dans le liquide pour la combustion du sucre, le Cystococcus, au lieu de prendre son carbone à l'atmosphère en cessant d'assimiler le glucose, continue au contraire à faire disparaître celui-ci, dès que, par l'action de sa chlorophylle, il s'est procuré assez d'oxygène pour le faire.

Le glucose est donc un aliment qui convient toujours mieux à la plante que l'anhydride carbonique.

Je n'ai pas cultivé l'algue, en atmosphère confinée, sur d'autres sucres que le glucose, mais ce que nous avons vu de leur assimilation fait prévoir qu'ils ne sauraient se comporter autrement que lui (sauf peut-être le saccharose).

Quand au rendement des cultures faites aux dépens du seul carbone de l'atmosphère, le faible poids des récoltes m'a naturellement empêché de le déterminer; mais ce calcul est pour ainsi dire inutile, le rendement ne peut être qu'excellent, comme du reste le coefficient d'utilisation du carbone. L'anhydride carbonique accélère moins que les sucres le développement du Cystococcus et est, à ce point de vue, moins bon aliment qu'eux, mais il est certainement le plus économique de tous.

Dans les cellules, qui n'ont pu trouver de carbone que dans l'air, je n'ai pu déceler aucun grain d'amidon; chaque cellule ayant à sa disposition les sels minéraux et l'azote dont elle peut avoir besoin, ne met pas de carbone en réserve : dès qu'elle en contient un excédent, elle l'utilise en se multipliant.

VI

QUELQUES CONSIDÉRATIONS SUR LA SYNTHÈSE DE LA MATIÈRE ORGANIQUE DANS LES CELLULES.

Si j'avais pu refaire sur le Cystococcus, ayant vécu exclusivement aux dépens du carbone de l'air, les expériences de MM. Brown et Morris [1] sur le Tropœolum majus, si j'avais pu déterminer la nature et la proportion de chacun des sucres présents dans les cellules de l'algue, les résultats, mis en face de ceux que j'ai obtenus dans les chapitres précédents, eussent donné des indications bien précieuses sur la synthèse de la

1. Brown et Morris, *Jorn of. Chem. Soc.* 1893.

matière organique par la plante. Malheureusement, il est impossible, en nourrissant le Cystococcus avec le seul carbone de l'atmosphère, d'obtenir une récolte suffisante pour permettre une pareille étude. J'en suis donc réduit à ne faire que des conjectures sur les mutations du carbone dans les cellules de l'algue.

La rapidité avec laquelle sont consommés le glucose et le lévulose fait supposer, avec beaucoup de vraisemblance, que ces sucres font partie de l'échelle de synthèse de la matière organique. Nous savons d'autre part que, vivant à la lumière, soit aux dépens de sucre, soit aux dépens de l'anhydride carbonique, le Cystococcus ne fabrique pas d'amidon dans ses cellules, à condition, bien entendu, que ni l'azote ni les sels minéraux ne lui fassent défaut; le carbone assimilé ne doit donc pas faire forcément partie d'une molécule d'amidon dans le cours de son évolution.

Le glucose et le lévulose seraient donc parmi les premiers produits de l'assimilation chlorophyllienne; l'amidon, quand il s'en fait, ne serait qu'une forme de réserve de ceux-ci.

Quant au saccharose, j'ignore s'il prend jamais naissance dans les cellules; sa présence est d'autant plus douteuse qu'il est, nous l'avons vu, assimilé avec une très grande lenteur et ne saurait contribuer à l'amylogénèse. Il est donc difficile d'admettre qu'il puisse être l'origine du glucose et du lévulose dans la plante, comme dans les feuilles de Tropœolum; il en serait plutôt une forme de réserve.

VII

BILAN DU CARBONE

Faire le bilan du carbone dans la culture d'un végétal, c'est déterminer d'une part le poids de carbone mis en œuvre pendant une certaine période de la vie de la plante, et de l'autre les poids de carbone qui se trouvent à la fin tant dans la plante que dans l'atmosphère et le sol.

En se rappelant ce que j'ai dit au début de ce mémoire sur le rôle du carbone dans les végétaux, on comprendra de suite combien les nombres qui figurent dans l'établissement du bilan ont un sens peu précis, quand il s'agit de végétaux à chloro-

phylle. Néanmoins. si le bilan du carbone d'une expérience faite isolément offre peu d'intérêt, la comparaison des bilans de 2 expériences, faites simultanément, mais de durées différentes, est instructive.

Dans aucun cas, je n'ai fait à proprement parler un bilan : je n'ai pas dosé séparément le carbone disparu du milieu, celui contenu dans la récolte et celui excrété dans le liquide de culture ou dégagé dans l'atmosphère; j'ai expliqué, page 404, pourquoi la présence de l'alcool m'empêchait de le faire. Mais connaissant trois de ces données, on peut en déduire la quatrième par différence, c'est ainsi que j'ai dû opérer.

Je ferai ainsi le bilan du carbone dans 2 cultures faites simultanément en atmosphère confinée et à la lumière, mais arrêtées l'une au bout de 11 jours et l'autre au bout de 25.

La seconde culture est celle qui fait l'objet de l'expérience relatée page 381. Je donne ci-dessous les données expérimentales qui se rapportent à la première.

Au bout de 11 jours, le liquide de culture, qui renfermait au début 505 milligrammes de glucose, n'en contient plus que 260; la plante a donc consommé 245 milligrammes de sucre. Le poids de la récolte est de 140 milligrammes.

L'atmosphère du ballon a été étudiée comme il est dit page 382 et suivantes; elle renfermait 2,1 0/0 d'anhydride carbonique et 22 0/0 d'oxygène. Le tableau X résume les changements qu'elle a subis du fait du développement de l'algue (les nombres y représentent des cent. cub.).

TABLEAU X.

	Début de la culture.	Fin de la culture.	Gains.
CO^2	0	16,5	16.5
O	158.1	172,5	14,4
Az	594,9	594,9	0
Totaux...	753	783,9	30,9

Je ferai remarquer en passant que l'oxygène dégagé montre

que la fonction chlorophyllienne s'exerce dès le début de la culture.

Pour établir le bilan du carbone dans les 2 expériences, voici la méthode suivie : le carbone mis en œuvre se déduit du poids de sucre disparu; celui qui est contenu dans les tissus de la plante est donné par l'analyse élémentaire de celle-ci, celui de l'atmosphère est calculé d'après le poids d'anhydride carbonique qu'elle renferme; enfin le carbone du liquide de culture est obtenu par différence; ce dernier comprend évidemment le carbone des carbonates produits par la combinaison d'une très faible partie du gaz carbonique dégagé avec les bases mises en liberté dans le milieu; il comprend aussi tout naturellement le carbone de l'alcool, qui s'est vaporisé au moment de l'extraction par la pompe à mercure des gaz du ballon.

Voici le bilan du carbone à la fin de l'expérience qui a duré 11 jours :

Carbone dans la plante	68 mgr.
— — l'atmosphère	9 —
— — le liquide	21 —
— du sucre disparu	98 mgr.

Le bilan du carbone dans l'expérience qui a duré 25 jours est le suivant :

Carbone dans la plante	109 mgr.
— — l'atmosphère	37 —
— — le liquide	56 —
— du sucre disparu	202 mgr.

Je l'ai dit, c'est la comparaison des 2 bilans qui est intéressante; elle permet, étant connu l'emploi des 98 premiers milligrammes de carbone pris au sucre, de trouver celui des 202 — 98 = 104 suivants; il est indiqué ci-dessous :

Carbone dans la plante	109 — 68 =	41 mgr.
— — l'atmosphère	37 — 9 =	28 —
— — le liquide	56 — 21 =	35 —
		104 mgr.

Dans la première période de sa vie (les 11 premiers jours), la plante fait surtout un travail de construction, puisqu'elle construit les 7/10 du carbone mis en œuvre.

Dans les 14 jours suivants, l'algue se multiplie peu et enrichit en carbone l'atmosphère et le liquide; c'est le moment où par sa zymase elle dédouble le sucre en alcool et anhydride carbonique, sans pouvoir oxyder l'alcool aussi vite qu'elle le produit; elle se livre alors surtout à un travail d'entretien.

Tout ceci ne fait que confirmer ce que j'ai dit de la marche de la consommation du sucre.

CONCLUSIONS

Le Cystococcus humicola peut être cultivé dans une solution minérale glucosée ; les récoltes sont assez abondantes pour qu'on puisse les peser. La plante, dont toutes les cellules contiennent de la chlorophylle, prend néanmoins son carbone au sucre. Le rendement de ces cultures est très élevé, il dépasse 1/2 ; il est dû à ceci, que la plante est capable, d'une part d'assimiler le glucose, comme une mucédinée, sans se servir de sa chlorophylle, et de l'autre de décomposer à la lumière l'anhydride carbonique qu'elle dégage en respirant.

Des cultures en atmosphère confinée prouvent que, contrairement à ce qu'il était légitime d'attendre de la part d'une plante verte exposée à la lumière, le Cystococcus, qui prend son carbone au glucose, dégage beaucoup d'anhydride carbonique ; il ne se met à décomposer ce gaz d'une manière énergique par sa chlorophylle que quand il manque d'oxygène pour brûler le sucre.

Les cellules, qui ont vécu à la lumière, ne renferment pas de grains d'amidon, mais très probablement des corps qui en dérivent comme l'amidon soluble, les dextrines.

A l'obscurité, la plante se multiplie plus lentement qu'à la lumière; ses cellules contiennent de la chlorophylle et sont remplies de gros grains d'amidon, qui disparaîtront quand l'algue aura faim de carbone. Le rendement réel est plus élevé que celui que l'on obtiendrait dans les mêmes conditions avec une plante sans chlorophylle, peut-être à cause de qualités spéciales du protoplasma des cellules vertes du Cystococcus.

Toutes les cultures renferment de l'alcool, en très petite quantité, quand l'aération n'a rien laissé à désirer, mais en proportion plus considérable si la plante a manqué d'oxygène.

Le saccharose est consommé par le Cystococcus, beaucoup plus lentement cependant que le glucose; le rendement est très élevé, il atteint 0,82. Le sucre n'est pas interverti en dehors des cellules, à moins que le liquide de culture ne contienne déjà au préalable du sucre interverti ; condition qui sollicite l'excrétion

de la sucrase. Quelles que soient les conditions d'éclairement, les cellules ne renferment pas d'amidon.

Le sucre interverti est un aliment qui aide beaucoup au développement rapide de la plante; le lévulose est absorbé un peu plus vite que le glucose. A la lumière, aussi bien qu'à l'obscurité, les cellules fabriquent de l'amidon, probablement parce que les deux sucres ne sont pas assimilés aussi vite l'un que l'autre.

Le Cystococcus prend très facilement son carbone au lévulose et l'utilise fort bien; en l'absence de lumière, ses cellules contiennent de l'amidon.

Tous les sucres précités sont des sources de carbone que l'algue préfère à l'anhydride carbonique, mais ce sont des aliments moins économiques.

L'alcool produit par la plante dans les milieux sucrés est vraisemblablement un produit intérimaire de la combustion du sucre ou, autrement dit, un aliment qui a besoin d'être oxydé pour être utilisé. Il semble que tout le sucre absorbé ne subisse pas cette transformation, et qu'une fraction puisse en être assimilée, sans être dédoublée par la zymase.

Quand la plante prend son carbone à l'atmosphère, le glucose et le lévulose sont probablement parmi les premiers produits de l'assimilation chlorophyllienne; l'amidon n'en est qu'une forme de réserve.

La comparaison des bilans de cultures, faites en milieu glucosé et en espace clos, prouve que, tant que le Cystococcus ne manque pas d'oxygène, il construit la plus grande partie du carbone mis en œuvre, pour se livrer surtout à un travail d'entretien, quand l'oxygène vient à lui faire défaut.

Je viens de résumer tous les faits que j'ai pu établir concernant la vie du Cystococcus : un grand nombre prouve bien que cette algue est une plante de transition, qui, par ses propriétés, vient combler le vide qui existe entre les plantes pourvues de chlorophylle et celles qui n'en ont pas.

1° Elle peut, comme une mucédinée, consommer rapidement le glucose, le sucre interverti, le lévulose, le saccharose ;

2° Dans ces cultures sur milieux sucrés, le coefficient d'utilisation du carbone est plus élevé que dans des cultures analogues de mucédinées ou de levure, mais il est moins fort que

s'il s'agissait de plantes vertes prenant leur carbone à l'anhydride carbonique ;

3° Dans une atmosphère confinée, la vie de l'algue se rapproche beaucoup au début de la culture de celle d'une mucédinée, pour être à la fin identique à celle d'une plante verte; dans l'intervalle, sa manière d'être tient à la fois de celles de deux sortes de plantes;

4° Le Cystococcus, à l'inverse de presque toutes les plantes vertes, peut faire la synthèse de sa chlorophylle à l'obscurité;

5° Mais il ressemble à ces plantes en ce qu'il est capable de concréter de l'amidon en grains dans ses cellules ;

6° J'ajouterai aussi que comme elles, il peut prendre très facilement son azote aux nitrates et sous certaines réserves à l'ammoniaque, ainsi que je l'ai établi dans un précédent mémoire [1].

Avant de conclure avec certitude que le Cystococcus est bien une plante de transition, je veux répondre à une objection qui vient naturellement à l'esprit.

J'ai dit, page 372, que M. Mazé avait constaté que le maïs peut à l'obscurité prendre de très faibles quantités de carbone au glucose; on est donc en droit de se demander si, en suivant avec soin et à la lumière le développement du maïs, on n'observerait pas des faits identiques à ceux dont j'ai reconnu l'existence chez le Cystococcus, et si les phénomènes que j'ai découverts dans la vie de ce dernier ne seraient pas généraux dans les plantes à chlorophylle, mais encore inconnus chez elles parce que l'étude n'en a pas été faite. Il n'en est rien. En examinant, en effet, les nombres donnés par M. Mazé, on est frappé de voir combien est faible l'accroissement de poids de la plante alimentée avec du glucose, ce qui concorde du reste absolument avec les résultats obtenus par M. Duclaux pendant la germination des haricots et des pois. Ces nombres sont tellement inférieurs à ceux fournis par le Cystococcus vivant à l'obscurité qu'ils suffisent amplement à prouver combien cette algue est plus apte à consommer les hydrates de carbone, et qu'elle est bien un être à part, comme tout ce mémoire le démontre.

Reste à se demander quelle est la place que paraît occuper le Cystococcus au point de vue phylogénique. La paléontologie

1. P.-G. Charpentier, *Annales Institut Pasteur*, mai 1903.

enseigne que les plus anciennes plantes connues, celles dont on trouve les restes dans les premiers terrains paléozoïques, sont des algues vertes; les premiers représentants du règne végétal à la surface du globe auraient donc été des plantes vertes. Cette hypothèse est très plausible; tous les êtres dégageant de l'anhydride carbonique, la vie fût devenue rapidement impossible sur la terre, s'il n'avait existé dès l'origine des êtres pouvant verser constamment de l'oxygène dans l'atmosphère, c'est-à-dire des plantes à chlorophylle. Il n'y a du reste aucune difficulté à admettre que certaines d'entre elles, trouvant de grandes quantités de matière organique à consommer, aient peu à peu perdu la faculté d'assimiler le carbone aérien et se soient adaptées à une vie parasitaire sur un substratum riche en carbone combiné.

Le Cystococcus humicola serait une plante de passage représentant un végétal vert en train de s'adapter à une vie nouvelle, celle dont jouissent actuellement les mucédinées.

LES

Entomophytes du charançon des betteraves à sucre.

(Cleonus punctiventris.)

PAR J. DANYSZ ET K. WIŽE.

(Travail du Laboratoire de microbie agricole à l'Institut Pasteur de Paris et de la station d'entomologie expérimentale de la « Société des fabricants de sucre de toute la Russie » de Smela. (Gouvernement de Kieff)

Les champignons pathogènes des insectes avaient été connus et étudiés bien longtemps avant les agents des maladies contagieuses de l'homme et des animaux supérieurs. Les naturalistes de la fin du XVIIIe et du commencement du XIXe siècle en ont décrit quelques espèces, sans, toutefois, chercher à comprendre leur importance et leur rôle comme agents pathogènes.

Mais, déjà en 1836, on trouve une série de travaux de Bassi [1], Balsamo, Barbô, Audouin [2], Montagne [3], Turpin [4] sur les Muscardines des vers à soie, où la nature contagieuse de la maladie et le rôle du champignon comme agent pathogène spécifique avaient été nettement reconnus. Ainsi, Audouin, Montagne et Turpin ont pu reproduire la maladie à volonté en transportant les spores du champignon (Botrytis ou Isaria) des chenilles muscardinées sur des chenilles saines des vers à soie et de plusieurs autres espèces d'insectes, en inoculant ces spores sous la peau ou simplement en mettant des individus sains en contact avec les muscardines. Ils ont même essayé, quelquefois avec succès, de cultiver la muscardine sur des milieux nutritifs artificiels.

Ces travaux n'ont pourtant éveillé alors que très peu d'atten-

1. BASSI, *C. R.* 1836, t. II, p. 434.
2. AUDOUIN, Recherches anatomiques et physiol. sur la maladie contagieuse qui attaque des vers à soie, et qu'on désigne sous le nom de Muscardine, *C. R.*, t. III 1836) p. 82.
3. MONTAGNE, *C. R.*, 1836, t. III, p. 166.
4. TURPIN, *Ibid.*, p. 170.

tion; pendant plus de 30 ans personne n'a eu l'idée de les reprendre et de les pousser plus loin.

Ce n'est, en effet, qu'en 1867, que l'on trouve une nouvelle étude d'une muscardinose due au *Botrytis bassiana*, observée par de Bary[1] sur le Bombyx Pini, insecte qui ravageait alors les forêts de l'Allemagne.

De Bary a trouvé que son botrytis n'envahit et ne se développe bien que sur des insectes vivants, que les spores placées à la surface de la cuticule d'une chenille vivante ne tardent pas à germer, et que les filaments mycéliens traversent la cuticule pour se ramifier et donner des conidies dans la cavité générale du corps. Ces mêmes spores, ensemencées sur une chenille morte, ne donnaient pas de culture.

De Bary n'a pas manqué de signaler l'importance pour l'économie agricole et forestière de ces champignons entomophytes qui, complètement inoffensifs pour les plantes et les animaux supérieurs, confèrent une maladie très contagieuse et toujours mortelle à un grand nombre d'espèces d'insectes. Mais, à cette époque, on ne connaissait pas encore les milieux de culture artificiels stériles, on ne pouvait pas obtenir des muscardines en cultures pures, il n'était donc guère possible de songer à multiplier ces champignons pour favoriser le développement des épidémies parmi les insectes et intervenir ainsi dans la défense des plantes.

Ce fut M. Metchnikoff, alors professeur à l'Université d'Odessa, qui, le premier, a eu cette idée et a pu la réaliser en 1878.

S'inspirant des travaux de de Bary, M. Metchnikoff s'est mis à la recherche d'un champignon pathogène pour le hanneton du blé (*Anisoplia austriaca*) qui faisait beaucoup de ravages en Russie méridionale.

M. Metchnikoff ne tarda pas à trouver des larves atteintes par divers parasites et principalement par une muscardine qu'il appela *Isaria destructrix*.

Peu de temps après, il trouva le même champignon sur un autre insecte, le *cleonus punctiventris*, un coléoptère très nuisible aux cultures des betteraves.

M. Metchnikoff est arrivé promptement à cultiver sa mus-

1. De Bary, Zur Kenntniss Insectentödtenden Pilze. *Bot. Zeit.*, t. XXV, 1867, p. 1, 9, 17 et *ibid.*, t. XXVII, 1869, p. 582.

cardine à l'état de pureté sur un bouillon préparé avec du moût de bière, et à infecter avec des spores provenant de ces cultures les *anisoplia* et les *cleonus* à tous les stades de leur développement.

La question de l'utilisation des muscardines dans la pratique était donc résolue en principe : en cultivant ces champignons sur des milieux nutritifs artificiels, on pouvait multiplier à volonté les foyers de contagion et arrêter le développement excessif des insectes; aussi l'impulsion donnée par M. Metchnikoff n'est-elle pas restée sans écho.

De nombreux naturalistes et agronomes se sont mis à l'œuvre, pour rechercher de nouvelles espèces d'entomophytes pathogènes pour les insectes les plus répandus et les plus nuisibles, et pour étudier les conditions de leur développement dans la nature et sur des milieux nutritifs artificiels.

Ainsi, à côté de nombreux travaux sur les *entomophtorées* qui nous intéressent moins pour le moment, parce qu'on n'a pas encore réussi à les cultiver, nous trouvons des travaux de Sorokin [1] sur un champignon pathogène pour l'*Agrotis segetum* (*Sorosporella agrotidis*) ; de MM. Taxter, Forber [2] et Snow [3] sur un champignon (*Sporotrichum globuliferum*) pathogène pour le *Blissus leucopterus*, une petite punaise qui dévaste les champs des céréales aux États-Unis de l'Amérique du Nord ; de M. A. Giard [4], sur un parasite du Criquet pèlerin, le *Lachnidium acridiorum* et un mémoire très important sur l'*Isaria densa*, un champignon pathogène pour le hanneton commun. Dans ce travail, M. Giard étudie avec beaucoup de détails l'évolution et les conditions de développement de ce champignon sur les insectes contaminés et sur des milieux nutritifs artificiels.

La production et l'application en grand de ces entomophytes et notamment de l'*Oospora destructrix*, Delacroix (*Is. destructrix* de Metchnikoff) de l'*Isaria densa*, Gd. (*Botrytis tenella*, Prillieux

1. Sorokin, dararitologirche Skizzen (*Centr. bl. f. Bact.* 1888, p. 645).
2. S. A. Forbes, Studien of the contagions diseases of insects. (*Bulletin of the Illinoissetat. Labr of nat. hist.*, vol. II, 1886).
3. F. H. Snow. Contagions diseases of the Chinch Bug. 1er, 2e et 8e report 1892, 93 et 94 (*University of Kansas, Laurence*).
4. A. Giard, Sur le champ. paras. des criquets pèlerins (*Lachnidium acridiorum*) *C. R.* 7 décembre 1891.
Et l'*Isaria densa* (Linx) Fries, champignon parasite du hanneton commun. *Bulletin scientifique de la France et de la Belgique*, XXIV, 1893.

été tentés par Krassilstchik en Russie, avec l'*oospora* contre le charançon des betteraves (*Cleonus punstiventris*); par Le Moult en France avec l'*Isaria densa* contre les hannetons et leurs larves, les redoutables « vers blancs », et enfin par Snow en Amérique et Trabut en Algérie, qui ont essayé de propager les épidémies causées par le *Sporotrichum*, le premier parmi les punaises des blés, le second parmi les altises de la vigne.

Tous ces premiers essais, entrepris dans des conditions souvent défectueuses et toujours avec des moyens trop restreints, n'ont pas pu donner les résultats qu'on en attendait.

On avait bien des cultures extrêmement virulentes pour les insectes, des cultures qui, au laboratoire, dans les essais en petit, tuaient infailliblement tous les insectes contaminés, mais on se heurtait, pour l'application de ces champignons en grande culture, à des difficultés, pour le moment insurmontables.

Les entomophytes ne se développent bien, ainsi que l'a déjà remarqué de Bary, que sur des microbes vivants ou sur des milieux nutritifs artificiels parfaitement stériles, et les méthodes de culture que l'on possédait alors étaient trop couteuses pour rendre possible leur application en grand.

C'est ainsi, par exemple, que M. Le Moult cultivait l'*isaria densa* sur des pommes de terre coupées en morceaux cylindriques de la grosseur d'un crayon et enfermés dans des tubes de verre. Chacun de ces tubes pouvait donner en 2 mois à peu près 2 à 3 grammes de culture et coûtait 1 franc. Pour propager la contagion dans un champ envahi par des vers blancs, M. Le Moult conseillait d'employer 10 à 20 de ces tubes par hectare, de faire enterrer un fragment de culture tous les quelques mètres.

On ne pouvait guère en mettre davantage, parce que le prix du traitement risquerait de dépasser la valeur de la récolte; mais il ne faut pas s'étonner qu'un tel traitement n'ait jamais pu donner des résultats appréciables.

Pour propager l'épidémie parmi les punaises des blés, M. Snow n'employait pas des cultures artificielles, mais des « momies [1] » d'insectes contaminés par le *Sporotrichum globuli-*

1. On appelle *momie* le corps d'un insecte tué par une muscardine. Tout l'intérieur du corps est alors rempli par le sclérote du champignon. Le cadavre devient dur et peut être conservé pendant très longtemps.

ferum. Cette méthode présentait encore plus d'inconvénients que celle de M. Le Moult : M. Snow ne pouvait obtenir ses cultures à l'état de spores qu'au moment où les invasions étaient déjà généralisées et avaient déjà produit des dommages considérables, et la quantité de culture qu'il pouvait obtenir en temps utile était trop minime pour les vastes espaces qu'il y avait à traiter.

On avait donc été obligé de reconnaître que, pour rendre les entomophytes utilisables dans la pratique, il fallait encore de nouvelles recherches. Il fallait établir, par une série d'expériences, les conditions dans lesquelles les cultures des entomophytes doivent être réparties dans les champs pour atteindre les insectes, et trouver une méthode de culture permettant de produire ces champignons en quantités suffisantes pour obtenir des résultats appréciables; il fallait, en outre, trouver un ensemble de circonstances permettant d'entreprendre ces recherches dans des conditions favorables et de les poursuivre pendant quelques années sans interruption.

Nous avons trouvé cet ensemble de circonstances en Russie méridionale, dans une région où on cultive principalement des betteraves à sucre, et où ces plantations sont envahies régulièrement chaque année par le charançon des betteraves, le *cleonus punctiventris*.

Les dommages causés par cet insecte peuvent être évalués à quelques millions de roubles par an, et, malgré les moyens de défense et de destruction employés, les quantités des insectes qui réapparaissent chaque année ne semblent pas diminuer; bien au contraire, l'invasion s'étend de plus en plus sur des régions jusqu'alors indemnes.

En présence de l'importance croissante de ces dommages, la « Société des fabricants de sucre de toute la Russie » a résolu, sur l'initiative de son président, le comte André Bobrinskoy, de soumettre la question de la défense des betteraves à une étude systématique et nous a confié le soin d'organiser ces recherches.

Nous avons commencé nos recherches en 1900, et ce sont les principaux résultats de nos observations et expériences sur le rôle et l'application possibles des entomophytes, faites dans le courant de ces trois années, que nous résumons dans les chapitres qui suivent.

Le charançon de betteraves (cleonus punctiventris).

Le *cleonus punctiventris* est une des plus grandes espèces du genre des *curculionidæ*. En dehors du midi de la Russie, où il s'est multiplié d'une façon tout à fait anormale, cet insecte n'a été signalé encore comme nuisible à l'agriculture qu'en Moravie et en Hongrie. En Russie, il a envahi jusqu'à présent les plantations des betteraves dans les gouvernements de Charkoff, de Kieff et de Podolie; il est encore à peu près inconnu en Volhynie et en Bessarabie et aussi plus à l'Est, où la culture des betteraves à sucre est un peu plus récente.

Avant l'introduction de ces cultures, le cléonus était inconnu dans ces régions en tant qu'insecte nuisible. Il vivait alors aux dépens de nombreuses chénopodiacées sauvages qui poussaient en abondance sur les vastes steppes encore incultes à cette époque.

Dans les endroits où on a défriché les steppes pour faire aussitôt de la betterave, le cléonus a donc passé directement des chénopodiacées sauvages sur ces plantations, tandis que dans les régions où, comme en Podolie, on a débuté par la culture des céréales, il a tout d'abord presque complètement disparu, faute d'une nourriture appropriée. Actuellement il envahit ces régions de nouveau par extension, et il n'est pas douteux que, si l'on ne trouve pas de moyens efficaces pour s'en défendre, il finira par envahir toutes les régions où la culture des betteraves sera faite en grand d'une façon durable, et où il trouvera un ensemble de conditions aussi favorables que dans le bassin du Dniéper, c'est-à-dire un sol bien meublé, de vastes plaines peu boisées et presque complèment dépourvues d'oiseaux insectivores, des printemps et des étés relativement bien secs, et surtout un assolement à longues périodes.

Les *cléonus* commencent à sortir de terre à l'état d'*imago* avec les premiers chauds rayons du soleil du printemps. Leur sortie accompagne ou précède un peu la germination et l'apparition des premières feuilles des betteraves, et c'est à ce moment qu'ils sont le plus dangereux. Un seul insecte peut dévorer en quelques minutes les deux petites feuilles qui apparaissent les premières et faire périr la plante; aussi, quand on trouve à ce moment 10 insectes par m. q. et quand on n'a pas les moyens de les ramasser rapidement, la récolte sera complètement perdue.

Leur sortie de terre s'opère à peu près pendant 2 mois (avril et mai), et comme ils vivent pendant 1 mois à six semaines (plus longtemps quand il fait froid que quand il fait chaud), on en trouve en abondance dans les champs pendant 3 mois 1/2.

Tous les efforts des cultivateurs tendent à préserver les récoltes surtout pendant les premiers 2 mois, jusqu'au moment où les betteraves seront assez grandes pour mieux résister elles-mêmes aux attaques des insectes. Pour préserver les récoltes, on est obligé de faire ramasser les cléonus chaque jour, pendant à peu près 2 mois.

L'accouplement des cléonus, suivi bientôt de la ponte des œufs, ne commence guère avant le 15 mai et dure 1 mois. La femelle pond, en moyenne, 40 œufs qu'elle dépose un à un, séparément, dans de petits trous qu'elle creuse avec son rostre à la surface du sol et qu'elle comble ensuite avec soin.

A la fin de juin on trouve déjà des larves attachées aux racines des betteraves, en août des nymphes, et en septembre des insectes parfaits. Bien entendu, il y a pour le cléonus, comme pour tout autre insecte, des exceptions à cette règle générale : on trouve des larves et des nymphes en octobre et en avril, il y a donc des individus dont le développement peut être retardé ou accéléré, mais ces quelques irrégularités sont de peu d'importance au point de vue qui nous préoccupe.

Les cléonus peuvent se nourrir de feuilles des chénopodiacées et de quelques papillonacées, mais ils manifestent toujours pour les feuilles des betteraves une prédilection très marquée. Aussitôt sortis de terre au printemps, ils s'empressent donc de quitter tous les autres champs pour envahir les plantations des betteraves; on les voit alors cheminer à travers les champs et les routes pour s'y rendre.

L'usage adopté en Russie de ne faire revenir les betteraves que tous les 4 ou 6 ans sur les mêmes champs, oblige les insectes de faire chaque année ces longs voyages, et les agriculteurs ne manquent pas de profiter de cette particularité pour en capturer un très grand nombre dans de petits fossés à parois verticales dont ils entourent les champs de betteraves. On en ramasse ainsi des centaines de quintaux chaque année dans chaque ferme.

Pendant les premiers 15 à 20 jours après leur sortie de terre, on trouve donc des cléonus un peu partout, mais ils se concen-

trent peu à peu tous sur les champs de betteraves; quand le soleil commence à chauffer, ils les envahissent au vol.

Pour déterminer les conditions d'une intervention éventuelle, il importe donc de noter que le cléonus vit à peu près un an, qu'il passe 10 mois de l'année dans la terre, de mai jusqu'en septembre à l'état d'œuf, de larve et de nymphe, de septembre jusqu'au printemps suivant à l'état d'imago et à la surface du sol pendant les 2 à 3 mois du printemps.

Le cléonus cause deux sortes de dommages : il mange à l'état d'*imago* les feuilles des betteraves au printemps, et à l'état de larve, les racines dans le courant de l'été. Pour défendre les feuilles, on a la ressource de ramasser les insectes ou de les empoisonner en aspergeant les feuilles avec des sels de baryum ou d'arsenic, et on le fait depuis longtemps déjà avec assez de succès, mais aucun moyen mécanique ou chimique ne peut convenir pour défendre les racines contre les dommages causés par les larves. Or la quantité d'insectes qui échappent au ramassage et à l'empoisonnement, et qui peuvent pondre des œufs sur les champs des betteraves, est encore toujours assez considérable pour causer des dommages très sensibles, et donner pour l'année suivante une nouvelle génération de cléonus, aussi nombreuse et le plus souvent même plus nombreuse que celle qui l'a précédée.

Il nous a donc semblé que seuls les ennemis naturels du cléonus, les insectivores (calosoma, mermis) et les entomophytes peuvent intervenir ici d'une façon efficace, et comme nous n'avions aucun moyen de favoriser le développement des insectivores, nous avons cherché à multiplier les entomophytes sur des milieux artificiels et à propager l'épidémie parmi les larves du cléonus à l'aide de ces cultures.

LES ÉPIDÉMIES SPONTANÉES DU CHARANÇON DE LA BETTERAVE

Avant de faire intervenir les cultures artificielles des entomophytes, il était nécessaire d'établir les conditions dans lesquelles se produisent les épidémies spontanées parmi les cléonus. Nous savions déjà, par les travaux de M. Metchnikoff et par les observations des agriculteurs locaux, que ces épidémies n'étaient pas rares; qu'à l'automne, au moment de la récolte et

même au printemps suivant, quand on labourait les anciens champs de betteraves, on trouvait toujours dans la terre des larves, des nymphes et même des jeunes *imago* « muscardinés ». On ne trouvait, par contre, presque jamais un *imago* contaminé au printemps à la surface du sol.

Un essai très simple nous a montré pourtant que les insectes adultes n'étaient pas réfractaires aux maladies causées par divers entomophytes : il suffisait d'en introduire un certain nombre dans une assiette garnie d'un peu de terre et de les mettre en contact avec une culture d'oospora, d'isaria ou de sporotrichum, pour les voir mourir infectés au bout de 5 à 10 jours.

En répétant l'expérience dans différentes conditions de température, d'humidité et de lumière, nous avons reconnu que les insectes adultes pouvaient être contaminés déjà à une température de 15°, à la condition d'être placés à l'obscurité ou à la lumière diffuse, tandis qu'une exposition de quelques heures par jour en plein soleil empêchait, le plus souvent, la contagion de se produire.

Les insectes qui sortent de terre au printemps ont souvent, avant d'arriver à la surface, à traverser une couche de terre très riche en entomophytes; un grand nombre a dû nécessairement venir en contact avec les spores de ces champignons et se contaminer, mais, parvenus à l'air, ils échappent à l'infection grâce à l'action stérilisante du soleil.

Là où la contagion naturelle restait sans effet, nous n'avions aucune chance de réussir avec une contagion artificielle. Les épidémies spontanées sont, au contraire, très fréquentes dans la terre et il nous a semblé qu'il suffirait de connaître les conditions dans lesquelles elle se développent d'elles-mêmes pour arriver sans beaucoup de peine à en favoriser la propagation au moyen de cultures artificielles.

Nous avons vu que les œufs du cleonus sont pondus en mai, que les larves aussitôt écloses s'enfoncent dans la terre pour subir toutes leurs transformations ultérieures, et que les insectes parfaits, formés en septembre-octobre, restent dans la terre jusqu'au printemps suivant. Pour étudier le développement des entomophytoses, il fallait donc commencer les recherches dans la terre depuis le mois de juin et les poursuivre jusqu'à la fin de l'automne.

En creusent dans différentes parties d'un champ de betteraves des trous de 1 m. q. sur 50 cm. de profondeur et en tamisant avec soin la terre enlevée, on peut assez exactement établir la quantité de larves qui ont envahi le champ et la proportion de celles qui ont succombé à l'infection.

Dans le tableau ci-contre (nº I), nous avons résumé les résultats de recherches exécutées de juin en septembre dans trois champs de betteraves d'une ferme,

Tableau I.

Nos des champs.	Dates des recherches	Insectes vivants par m. c. en moyenne. larves.	nymphes.	imago.	Insectes morts infectés par m. c., en moyenne. larves.	nymphes.	imago.
Champ Nº 1.	juin.	207	—	5	6	—	-
	juillet.	86	—	2	86	—	—
	août.	12	9	—	93	44	—
	septemb.	—	1	3	15	37	22
	De 207 larves qui ont envahi le champ en juin, 4 seulement ont échappé à l'infection et ont pu arriver au terme de leur développement.						
Champ Nº 2.	juin.	282	—	6	18	—	—
	juillet.	35	—	1	91	—	—
	août.	17	16	—	32	66	—
	septemb.	—	—	4	—	11	22
	De 282 larves en juin, 4 insectes ont survécu jusqu'en octobre.						
Champ Nº 3	juin.	410	—	7	2	—	—
	juillet.	380	—	—	23	—	—
	août.	163	185	—	19	38	—
	septemb.	27	93	158	7	21	5
	De 410 larves en juin, 278 insectes ont survécu jusqu'en octobre.						

Ce tableau nous montre d'abord l'énorme importance des épidémies spontanées produites dans certains champs par les entomophytes. Dans les champs nos 1 et 2 par exemple, la destruction des larves et des nymphes qui se sont développées des œufs pondus au printemps avait été presque complète : 97 à 99 0/0. Tous ces insectes ont-ils disparu du fait de l'infection? Les données du tableau ne le montrent pas nettement! Ainsi, sur les 203 individus disparus dans le champ nº 1, nous

n'avons retrouvé que 152 cadavres infectés et momifiés (93 larves, 47 nymphes et 12 imago), les 51 qui manquent ont donc pu succomber à d'autres causes ; mais le fait, très constant, que la quantité de larves momifiées trouvées en juillet est souvent supérieure à celle trouvée en août et toujours de beaucoup supérieure à celle trouvée en septembre, montre clairement que les momies tombent en poussière assez rapidement et ne peuvent plus être retrouvées. Il est donc certain que la grande majorité de celles qui manquent à l'appel ont succombé aussi à l'action des entomophytes.

La maladie commence donc en juin par quelques cas assez rares et continue à faire des victimes de plus en plus nombreuses jusqu'à la fin de septembre, et même jusqu'en octobre si la température est assez élevée pour permettre la germination des spores.

Comment doit-on s'expliquer cette croissance de l'épidémie ? On ne peut guère admettre que dans ce cas la maladie se propage par contagion entre individus sains et malades, — et cela pour plusieurs raisons. D'abord parce que les larves de cléonus sont peu mobiles et vivent séparées les unes des autres par des couches de terre plus ou moins épaisses, et surtout parce que les individus malades ne peuvent devenir contagieux que huit à dix jours après leur mort, quand le champignon aura produit des spores et des hyphasmates à la surface de leurs corps, c'est-à-dire au moment où les larves encore saines de la même génération seront déjà descendues un peu plus bas dans la terre. — Nous savons, en effet que les œufs du cléonus sont pondus à la surface du sol, et que les larves qui en proviennent s'enfoncent jusqu'à 30 à 40 centimètres de profondeur pour se transformer en nymphes. Elles ne refont jamais le chemin en sens inverse.

Enfin, les nymphes, complètement immobiles, ne peuvent être infectées que par les spores qu'elles trouvent sur place.

Il faut donc admettre que la grande majorité. sinon sous les insectes qui périssent dans la terre dans le courant d'une saison, sont infectés par les spores des entomophytes qui existaient dans la terre au moment de l'invasion. Dans le cas particulier qui nous préoccupe, c'est-à-dire dans le cas de la destruction des cléonus vivant à l'état de larves et de nymphes dans la terre par les entomophytes, il n'y a donc pas d'épidémie qui commencerait en juin par quelques cas assez rares et se développerait

ensuite d'elle-même par contagion, mais une endémie dont le développement dépend de la température du sol et l'intensité de la richesse de différents champs en entomophytes.

Certains champs, comme par exemple les champs nos 1 et 2 du tableau I, deviennent inhabitables pour les cléonus et pour certains autres insectes qui passent quelques mois de la belle saison dans la terre, parce qu'ils sont tellement riches en entomophytes que presque tous les insectes qui y entrent à l'état de larves s'infectent et périssent avant l'époque où ils pourraient en sortir à l'état parfait.

Il était alors intéressant d'étudier un grand nombre de champs au point de leur richesse en entomophytes. Nous savions que tous les champs de la région envahie par les cléonus n'étaient pas également infectés par les champignons; — dans le champ no 3, par exemple, la proportion des insectes détruits ne dépassait pas 33 0/0 — et nous pensions qu'en tenant compte de la nature chimique et physique du sol et du sous-sol de tous les champs examinés, nous pouvions être amenés à trouver les causes de ces différences.

Nous avons examiné ainsi pendant trois étés successifs 317 champs dans 127 fermes situées dans différentes parties des gouvernements de Kieff et de Podolie, et nous avons pu noter les données suivantes :

Dans 30 0/0 environ de tous les champs examinés, les entomophytes s'opposent victorieusement à la multiplication des cléonus. La proportion des insectes contaminés dépasse 95 0/0, la quantité d'insectes qui sortiront indemnes de ces champs sera donc toujours inférieure à la quantité de ceux qui y sont entrés.

Dans tous les autres champs, au contraire, dans lesquels la proportion des insectes infectés est inférieure à 80 0/0, la quantité de cléonus continuera à augmenter chaque année.

L'examen chimique et physique de la nature du sol et du sous-sol de tous les champs étudié, ne nous a fourni aucune indication intéressante sur les causes probables des différences constatées dans le développement des entomophytes. Les terres arables du bassin du Dniéper présentent une très grande uniformité de composition, c'est partout du « tchernoziem » (terre noire très riche en humus) et les différences de perméabi-

lité du sous-sol semblent avoir très peu d'influence sur la fréquence de ces champignons.

Ce n'est qu'en étudiant l'histoire agricole de chaque champ, et notamment en établissant des comparaisons entre l'ancienneté de sa mise en culture pour les betteraves à sucre et la fréquence de ces cultures d'une part, et sa richesse en entomophytes d'autre part, que nous avons trouvé la cause probable de ces différences.

Les champs dans lesquels on cultivait des betteraves depuis 60 ans à des intervalles de 4 à 5 ans étaient toujours très riches en entomophytes; ceux, au contraire, dans lesquels on semait les betteraves pour la première fois, n'en contenaient que très peu. Dans les premiers cas, la destruction des insectes était presque complète, dans les derniers elle dépassait rarement 1 à 2 0/0.

Entre ces deux extrêmes il y avait, bien entendu, tous les intermédiaires, mais il y avait toujours une concordance tellement nette entre l'ancienneté ou la fréquence des cultures des betteraves dans un champ et sa richesse en entomophytes, que nous avons pu dresser un tableau indiquant la richesse en entomophytes de tous les champs dont il était possible de reconstituer l'histoire.

L'explication de cette concordance est extrêmement simple. Nous avons vu plus haut que les cléonus se concentrent chaque printemps sur les nouvelles plantations des betteraves, et que c'est presque exclusivement sur ces plantations qu'ils pondent leurs œufs. Or, les larves de cléonus s'infectent très facilement et constituent pour les entomophytes un milieu de culture et de multiplication très favorable. Chaque retour des betteraves et par conséquent aussi des insectes sur le même champ y amenait donc une nouvelle multiplication des entomophytes. Plus il y avait de ces retours périodiques et plus ils étaient rapprochés les uns des autres, plus riche aussi devenait le champ en spores de nos champignons, de sorte qu'après 10 à 12 de ces retours à 5 ans d'intervalle, le champ devenait inhabitable pour les insectes.

Comme l'intervalle de 5 ans est le plus court que l'on ait l'habitude de laisser dans ces régions entre deux cultures successives des betteraves, il faut donc, quand on laisse la nature

agir toute seule, au moins 50 à 60 ans pour arriver à ce résultat. Quand les périodes d'assolement sont plus longues, et elles sont souvent de 6 à 10 années, alors il faut un temps beaucoup plus long pour y arriver, et même on risque de n'y parvenir jamais, parce que les spores ou plutôt les conidies des entomophytes les plus répandues et les plus virulentes ne se conservent pas aussi bien et aussi longtemps que les endospores de certaines bactéries. Elles sont détruites non seulement par le temps, par le manque d'aliments appropriés et par le labourage qui, en retournant chaque année une couche de terre d'une certaine épaisseur, en expose une certaine quantité à l'air et au soleil, mais aussi par de nombreux parasites, champignons, anguillules et acariens, qui vivent à leurs dépens.

Ces pertes sont compensées en partie par le développement des entomophytes sur des larves d'autres insectes, des anisoplia, melolontha, agriotes, agrotis, qui vivent sur les céréales, de nombreuses espèces de curculionides qui vivent sur les papilionacées, de sorte que la quantité d'entomophytes qui peuplent tous les champs cultivés de cette région devrait augmenter avec le temps d'une façon très lente, mais à peu près constante, surtout dans la couche du sol qui n'est pas atteinte par les labours 15 à 40 centimètres de profondeur), et dans laquelle les entomophytes échappent mieux à l'action stérilisante de l'air, de la (lumière, des variations atmosphériques et même aux atteintes de leurs parasites.

Nous connaissons des fermes dont tous les champs sont actuellement assez riches en entomophytes pour rendre la multiplication progressive des cléonus impossible. La destruction n'est jamais complète, mais la quantité de ceux qui échappent chaque année à l'infection est insuffisante pour mettre les plantations des betteraves en danger. On en trouve, au printemps, tout au plus 1 à 2 kilogrammes (7,000 à 15,000 individus) par hectare. Le développement des cléonus, des entomophytes et de leurs parasites est arrivé dans les champs de ces fermes à un état d'équilibre à peu près stable, qui ne pourra plus être troublé que par un changement des assolements ou des cultures.

On n'est en effet arrivé à ce résultat que dans des fermes bien administrées et cultivées de la même façon depuis à peu près 50 à 60 ans, c'est-à-dire depuis l'introduction de la culture des

betteraves à sucre dans ces contrées. Dans les fermes, au contraire, dans lesquelles il y avait des interruptions dans la culture des betteraves, dans lesquelles on a changé une ou plusieurs fois dans le même espace de temps le système d'assolement ou de culture, on trouve parfois des champs riches en entomophytes, mais on en trouve aussi où la proportion des insectes infectés ne dépasse pas 10 à 20 0/0.

De l'ensemble de ces observations, on peut conclure que les entomophytes peuvent infecter et faire périr dans la terre, dans le courant d'une saison, presque toutes les larves et nymphes d'une génération de cléonus, qu'il faut 50 à 60 ans de culture régulière, dans laquelle les betteraves reviennent sur les mêmes champs tous les 4 ou 5 ans, pour arriver à ce résultat, et enfin que les maladies causées par les entomophytes ne se propagent pas par contagion entre individus malades et sains, mais que la proportion des infectés dépend de la richesse du sol en spores de ces champignons au moment de l'invasion des insectes.

Ces observations nous ont permis aussi de déterminer d'avance la richesse d'un champ en entomophytes d'une façon beaucoup plus précise que nous n'aurions pu le faire au moyen d'un examen direct de la terre au microscope ou par des cultures, fait très important au point de vue de l'appréciation des résultats des expériences d'infection artificielle que nous avions à entreprendre.

Les entomophytes qui infectent le charançon des betteraves.

Nous avons trouvé jusqu'à présent 8 espèces d'entomophytes sur les larves, les nymphes et les imago du *cleonus punctiventris*. Quatre de ces espèces étaient déjà connues avant que nous ayons commencé nos recherches, ce sont :

L'*Oospora destructrix* Delacroix, découverte par M. Metchnikoff, (*Isaria destructor*) sur des larves d'anisoplia et de cléonus;

La *Sorosporella uvella*. Giard, découverte par Sorokin (*Sorosporella agrotidis*) et Krassilstchik (*Tarichium uvella*) ;

L'*Isaria farinosa* et le *Sporotrichum globuliferum*, espèces connues et décrites depuis fort longtemps.

Les quatre autres espèces sont nouvelles. Deux espèces de *Massospora*, une à spores orange échinulées, l'autre à spores rouges cloisonnées : une ascosporée que nous appellerons — sur

le conseil de M. Matruchot qui a bien voulu nous aider dans la classification de tous ces champignons, — *Stilbella pseudomortierella*, et un *Verticillium* à mycélium blanc et à conidies ovoïdes très analogues à celles de l'*Isaria densa*. Nous l'appellerons *V. Orana*.

Trois de ces espèces, l'*Isaria*, le *Sporotrichum* et le *Verticillium*, infectent presque exclusivement les insectes parfaits, et, comme les cas de ces infections sont extrêmement rares et ne peuvent se produire que dans des conditions exceptionnelles, ces trois champignons présentent pour la pratique très peu d'intérêt. Nous les laisserons donc provisoirement de côté.

Les 5 autres espèces se développent exclusivement dans la terre et présentent aussi, au point de vue de leur fréquence et de leur intérêt pour l'agriculture, des différences considérables. Sur 100 individus morts d'infection, on trouve, en moyenne, 60 à 70 infectés par l'*Oospora*, 30 à 38 0/0 par la *Sorosporella* et à peine 2 0/0 par les deux *Massospora* et la *Stilbella* ensemble.

Au point de vue de la façon dont ils les infectent et dont ils se développent dans les corps des insectes infectés, on peut diviser ces champignons en trois groupes, dont un sera formé par l'*Oospora*, l'*Isaria*, le *Sporotrichum* et le *Verticillium*, un autre par la *Sorosporella* et les deux espèces de *Massospora*, le troisième par la *Stilbella*.

Oospora destructrix.

Comme type de l'infection du premier groupe, on peut prendre celle du hanneton vulgaire (*Melolontha vulgaris*) par l'*Isaria densa*, décrite par M. A. Giard. Pour ces quatre espèces d'entomophytes, l'infection se produit par la germination des conidies à la surface de la cuticule de l'insecte. Le ou les filaments de la conidie germée pénètrent à travers la cuticule dans la cavité générale du corps, s'y ramifient, et produisent de nouvelles conidies qui s'en détachent, sont entraînées par la circulation et par les leucocytes dont toutes les parties du corps, germent à leur tour, et remplissent bientôt le corps tout entier d'un feutrage très dense que l'on a appelé *sclérote*. Les conidies sont bien englobées par les leucocytes, mais n'en continuent pas moins à se multiplier.

On ne trouve plus alors à l'intérieur du corps de l'insecte que le revêtement chitineux du tube digestif; tout le reste, tous les

tissus ont été digérés et absorbés par les filaments du champignon. Le revêtement chitineux extérieur est intact au début et conserve la forme de l'insecte, mais bientôt, quand le sclérote se trouve dans des conditions de température et d'humidité convenables, il pousse à travers la cuticule des filaments mycéliens qui recouvrent tout le corps d'une toison très dense, et produisent aussitôt des conidies.

A une température de 18 à 20° et dans une humidité convenable, tout ce processus, depuis la contagion jusqu'à la production des conidies à la surface de la cuticule, peut durer 10 à 15 jours. Ensuite les filaments mycéliens s'agrègent par places et produisent des excroissances assez caractéristiques pour chaque espèce. Le mycélium du Sporotrichum forme des massues, celui de l'Isaria des filaments irréguliers, celui de l'Oospora des lanières plus ou moins larges et frangées au bout, analogues à celles de certains lichens. Sur tous ces filaments il se forme des conidies en quantité de plus en plus grande aux dépens des réserves du sclérote enfermé dans la cuticule. En fin de compte, tous les filaments du mycélium agrégé en hyphasmates et ceux du sclérote se transforment en spores, le tout devient extrêmement friable et tombe en poussière au moindre choc.

Pour l'*Oospora*, qui seule de ces 4 espèces nous intéresse au point de vue pratique, elle forme de beaux hyphasmates, surtout sur les nymphes des cleonus. On trouve dans la terre ces nymphes momifiées, garnies de leurs hyphasmates formés dans le courant d'un été, encore en bon état au printemps suivant; on n'en trouve plus en automne; elles ne durent donc pas plus d'une année.

Un sclérote frais est toujours une culture absolument pure du champignon qui l'a formé. On n'y découvre ni microbes étrangers, ni la moindre trace du tissu de l'insecte; tout, les albuminoïdes et les graisses, a été digéré et absorbé par les filaments mycéliens. Un insecte infecté par un entomophyte n'est pas tué par une sécrétion toxique, mais simplement digéré.

En faisant macérer dans de l'eau physiologique une culture d'Oospora broyée, nous avons obtenu un liquide qui digère *in vitro* la gélatine, la fibrine et le blanc d'œuf cuit, avec formation de peptone, et qui oxyde la tyrosine. Le mycélium d'Ospora pro-

duit donc des diastases protéolytiques très énergiques et aussi de la tyrosinase.

Culture sur des milieux nutritifs artificiels. — Les spores d'Oospora, mélangées à de la terre végétale ordinaire, ne donnent pas de culture proprement dite.

Elles germent comme dans l'eau, et donnent quelques conidies, mais la quantité de spores qui en résulte n'est pas plus grande que celle qu'on a semée.

Elles ne se développent non plus ni sur des débris végétaux ou animaux, ni même sur des cadavres d'insectes. Dans les milieux non stériles, toutes les parcelles nutritives sont envahies par des microbes et des moisissures banales, qui se développent beaucoup plus facilement et rapidement que les entomophytes, et ne laissent plus de place pour ces dernières. Même quand on introduit dans de la terre non stérilisée une culture sur pomme de terre, déjà bien développée, elle est promptement envahie par des moisissures et des acariens, et ne tarde pas à disparaître. Par contre, sur des milieux nutritifs stériles, et notamment sur pomme de terre, l'Oospora donne des cultures aussi rapidement et aussi abondantes que quand elle se développe sur des insectes vivants.

A une température de 22° à 25°, on obtient sur pomme de terre des cultures bien sporulées en 15 à 20 jours. Placée dans du terreau stérilisé, modérément humide, une telle culture continue à se développer comme un sclérote placé dans les mêmes conditions, et donne en 2 à 3 mois une récolte de conidies beaucoup plus riche que si on avait laissé la culture continuer à se développer à l'air, dans un tube de verre ou dans une chambre humide.

Sorosporella uvella.

Les entomophytes du deuxième groupe, formé par la *Sorosporella* et les deux espèces de *Massospora*, se développent d'une tout autre façon dans le corps des insectes qu'ils ont infectés. Une larve ou une nymphe de *cleonus*, tuée par un de ces champignons, se présente sous forme d'un sac rempli de granules rouges et jaunes. L'enveloppe de ce sac, la cuticule chitineuse transparente, garde bien la forme de l'insecte, mais elle devient

vite très fragile; quand on la déchire, les granules s'en échappent en poussière. Ces granules sont formées par des spores agglomérées sans trace de filaments mycéliens. Les spores sont rondes, beaucoup plus volumineuses que celles de l'*Oospora* et des Isariées, et pourvues d'une enveloppe beaucoup plus épaisse.

C'est dans cet état que l'on trouve des larves et des nymphes des *cleonus* infectées par la *Sorosporella* dans la terre, en août et en septembre, dans les champs de betteraves, et c'est encore dans le même état qu'on les retrouve l'année suivante au printemps et en été. De quelle façon se fait l'infection, comment se développe le champignon une fois qu'il a pénétré dans le corps de l'insecte? Nous n'avons pas pu l'observer directement jusqu'à présent, parce que nous n'avons pas réussi à contaminer les insectes avec les spores contenues dans les sacs. Pourtant, nous avons obtenu des cultures de *Sorosporella* sur pomme de terre, et nous avons constaté que ces spores se multiplient par division en deux à l'intérieur de leurs enveloppes. Quand la division est bien accomplie, la coque extérieure éclate, et les deux jeunes cellules qui en sortent, pourvues d'enveloppes minces, continuent de suite à se subdiviser en deux ou en quatre, tant qu'elles trouvent des matières nutritives à leur portée. Quand le milieu est épuisé ou devient inutilisable par suite de sa dessiccation, toutes ces jeunes cellules se recouvrent de l'épaisse coque caractéristique et deviennent des spores identiques à la spore initiale.

C'est de cette façon que, selon toute probabilité, les choses doivent se passer dans la cavité générale d'un insecte contaminé. Les spores se multiplient tant qu'elles trouvent du liquide et des tissus de l'organisme pour se nourrir. Quand tout est épuisé, quand les cellules remplissent complètement la cuticule de l'insecte, la multiplication s'arrête, toutes les cellules se transforment en spores à parois épaisses qui ne se développeront plus tant qu'elles resteront enfermées dans la cuticule. Nous ne savons pas encore quel sera le développement ultérieur de ces spores quand elles se trouveront disséminées dans la terre par suite de la destruction de la cuticule. Sur pomme de terre ou sur gélose, quand on maintient le milieu suffisamment longtemps à un degré d'humidité convenable, un certain nombre de jeunes cellules produisent des filaments mycéliens. Le mycélium apparaît plus rapidement (au bout de 15 à 20 jours), à une température

de 20 à 24°, qu'à la température de l'étuve à 35° (30 à 40 jours).

A cet état, la *Sorosporella* n'est pas plus contagieuse qu'à l'état de spores.

C'est tout ce que nous avons pu observer jusqu'à présent sur le développement de la *Sorosporella*. Des essais de culture et des expériences en cours nous en apprendront peut-être davantage dans le courant de cette année ou l'année prochaine, parce que l'évolution de ce champignon semble être relativement très lente — et le fait que les deux états de développement que nous connaissons déjà ne sont pas contagieux, tandis qu'il y a toujours un nombre considérable d'insectes contaminés dans la terre, nous fait supposer que ces recherches nous réservent des trouvailles intéressantes.

Les deux *Massopora* n'ont voulu pousser jusqu'à présent sur aucun milieu nutritif artificiel.

Au point de vue du rôle que la *Sorosporella* peut jouer concurremment avec l'*Oospora*, dans la lutte avec le *cleonus*, il est important de noter que les cas d'infection par la *Sorosporella* deviennent avec le temps de plus en plus fréquents. Ainsi, d'après les souvenirs de M. Metchnikoff, qui avait étudié les entomophytes de ces régions en 1880-83, on ne trouvait alors qu'un cas d'infection par la *Sorosporella* pour 1,000 d'*Oospora*. Aujourd'hui, cette proportion est de 1 à 3 en moyenne, et il y a des régions où la sorosporellose est déjà plus fréquente que l'oosporose. La résistance beaucoup plus grande des spores de la Sorosporella, et peut-être aussi la lenteur de son évolution nous expliquent très bien ce phénomène, et il est certain que, si rien ne vient troubler l'état de choses qui s'établit naturellement, la *Sorosporella* finira peut-être par prendre le dessus sur l'*Oospora*, et deviendra probablement un ennemi plus redoutable pour le *cleonus* que ne l'est actuellement cette dernière.

Stilbella pseudomortierella.

Les cas d'infection produits par cette espèce sont encore extrêmement rares.

Nous l'avons trouvé dans la proportion de 1 cas pour 1,000 produits par tous les autres entomophytes ensemble.

Elle est pourtant bien intéressante et peut devenir bien

importante, parce qu'elle produit des *asques* à l'extérieur du sclérote très dur et très résistant, et à l'extérieur de la cuticule de l'insecte momifié des conidies très contagieuses.

La *Stilbella* se laisse assez facilement cultiver sur pomme de terre, mais se développe lentement et donne des cultures assez maigres. Jusqu'à présent, nous n'avons pas encore pu obtenir des asques sur des milieux artificiels.

Tant qu'on n'aura pas trouvé des milieux de culture dans lesquels ce champignon pourra donner plus rapidement des cultures abondantes, on ne pourra guère s'en servir dans la pratique.

ESSAIS D'APPLICATION EN GRAND DES CULTURES ARTIFICIELLES D'OOSPORA A LA DESTRUCTION DES CLEONUS

De tous les entomophytes du charançon des betteraves, c'est l'espèce découverte par M. Metchnikoff, l'*Oospora destructrix* qui semblait devoir donner dans la pratique, le plus facilement, les résultats les plus appréciables, parce que, étant presque partout plus fréquente, elle semblait trouver dans la nature des conditions plus favorables à son développement que tous les autres entomophytes que nous venons de passer en revue, et aussi parce qu'elle pouvait donner, en culture artificielle, rapidement une récolte de beaucoup la plus abondante.

Tous nos essais en grand n'avaient donc été faites jusqu'à présent qu'avec des cultures d'oospora.

D'après ce que nous avons vu plus haut sur les conditions d'infection du *cleonus* dans la nature, on ne peut atteindre ces insectes à l'aide des cultures d'entomophytes qu'au moment où ils se trouvent dans la terre des champs de betteraves à l'état de larves et de nymphes. Nous avons vu aussi qu'il ne fallait pas compter beaucoup sur la propagation de la maladie par contagion entre individus sains et malades. Pour obtenir un effet appréciable, il était donc nécessaire d'introduire dans la terre une quantité suffisante de cultures pathogènes pour que la majorité de larves et de nymphes puissent les rencontrer et s'infecter. Nous pensions que cette quantité ne pourrait par être inférieure à quelques kilogrammes par hectare.

Pour produire des cultures d'*Oospora* en grandes quantités,

nous avons pensé à utiliser tout d'abord les grandes quantités de *cleonus* que l'on ramasse au printemps. On en ramasse plusieurs mètres cubes dans chaque ferme, et il nous semblait facile de contaminer ces masses d'insectes à l'état vivant et de les mélanger ensuite avec de la terre pour provoquer le développement des sclérotes et des hyphasmates.

En procédant ainsi, nous espérions pouvoir produire de grandes quantités de cultures d'*Oospora* d'une façon relativement très simple en économisant les frais et les nombreuses manipulations que nécessite la stérilisation des milieux de culture. Ce procédé avait aussi le grand avantage d'être à la por-

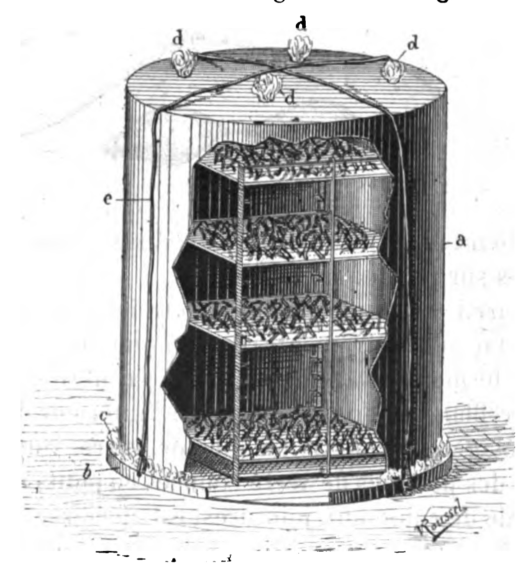


Fig. 1.

tée de tous les agriculteurs et, s'il avait réussi, il aurait pu donner rapidement d'excellents résultats.

Malheureusement, notre espoir avait été vite déçu.

L'infection en masse des *cleonus* a très bien réussi, mais, quand on a mélangé les cadavres des insectes avec de la terre, il s'est développé sur ces cadavres une telle quantité d'acariens, si friands de nos cultures d'*Oospora*, que les conidies qui commençaient à se former et les sclérotes ont complètement disparu en quelques semaines.

Nous avons bien vite acquis la certitude que ces acariens ne

provenaient pas seulement de la terre, mais des *cleonus* eux-mêmes qu'ils infectaient en parasites pendant la vie de ces derniers; ils se multipliaient avec une rapidité étonnante sur leurs cadavres. La stérilisation de la terre n'aurait donc pas pu remédier à cet inconvénient, et nous avons été obligés d'abandonner provisoirement ce système de culture pour des cultures

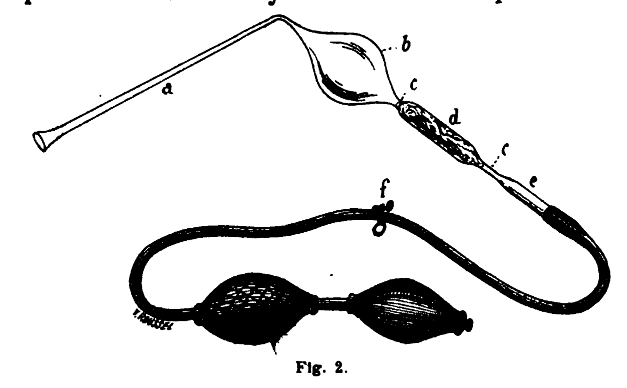


Fig. 2.

sur des milieux nutritifs artificiels stérilisés, et notamment pour des cultures sur pomme de terre.

Un appareil très simple nous a permis d'en produire beaucoup d'une façon relativement très économique.

Comme le montre la figure 1, cet appareil se compose d'une boîte en fer-blanc ou en tôle de zinc, à l'intérieur de laquelle on place une étagère garnie de plaques de verre. Sur ces plaques on dispose des pommes de terre coupées en petits morceaux. La boîte, garnie de coton aux jointures, est stérilisée à l'autoclave. Après stérilisation, on ensemence l'*Oospora* sur les pommes de terre en insufflant des spores dans l'appareil par les ouvertures *d* avec la pipette fig. 2, dont le renflement (*b*) avait été préalablement à moitié rempli de spores par aspiration.

Après 15 à 20 jours à une température de 20° à 25°, quand l'oospora a déjà formé des conidies, on détache les cultures des plaques de verre et on les place dans des caisses en bois sur plusieurs couches superposées, en séparant chaque couche de culture par une couche de terreau stérilisé avec du sulfure de carbone. Placée dans ces conditions, l'*Oospora* continue à se développer et, au bout de 4 à 5 mois, on obtient une terre très riche en spores.

Le prix de revient de cette terre chargée de spores est de

2 francs le kilogr. environ, et nous pensons que si on la distribue à raison de 10 kilogr. par hectare, on obtiendra déjà des résultats très appréciables.

On peut s'en rendre compte par l'expérience dont les résultats sont résumés dans le tableau II.

Cette première expérience en grand avait été faite l'année dernière (1902) dans le domaine de Sencla (Russie, gouv. de

TABLEAU II.

Quantité de muscardine.	Numéro de la prise	Larves vivantes du cleonus.	Chrysalides vivantes.	Insectes parfaits vivants.	Insectes vivants en tout.	Insectes contaminés par oospora
Parcelle n° 1 non traitée.	2	7	7	7	21	2
	3	4	15	14	33	0
	4	5	12	9	26	1
	5	2	8	11	21	0
		2	12	22	36	0
Parcelle n° 2 avec 1 kil. d'oospora par hect.	1	0	18	10	28	1
	2	8	0	24	32	0
	3	2	7	9	18	1
	4	3	9	15	27	3
	5	1	4	12	17	3
Parcelle n° 3 avec 2 kil. par hect.	1	2	17	31	50	3
	2	1	15	8	24	3
	3	1	13	18	32	1
	4	2	4	6	12	9
	5	2	9	2	12	0
Parcelle n° 4 avec 3 kil. par hect.	1	0	9	13	22	2
	2	0	14	53	67	9
	3	1	3	6	10	0
	4	0	4	4	8	2
	5	0	10	22	32	1
Parcelle n° 5 avec 5 kigr. par hect.	1	1	15	57	73	25
	2	1	9	15	23	14
	3	0	7	15	22	9
	4	0	4	28	32	2
	5	0	7	17	24	22
Parcelle n° 6 avec 10 kil. par hect.	1	0	11	11	22	14
	2	0	10	19	29	14
	3	0	6	35	41	20
	4	1	13	25	39	9
	5	0	5	27	32	3

Kieff) appartenant à M. le comte Léon Bobrinskoy, qui a bien voulu nous prêter son concours le plus empressé.

Nous avons traité :

1° 4 hectares d'un champ de betteraves avec 1 kilog. de culture par hectare.
2° 4 hectares avec 2 kilog. de culture par hectare.
3° 3 — — 3 — — —
4° 2 — — 5 — — —
5° 1 — — 10 — — —

La parcelle témoin (non traitée) était de 7 hectares.

Nous avons choisi pour cette expérience un champ qui, d'après nos prévisions, devait être naturellement encore très pauvre en entomophytes, c'est-à-dire un champ qui ne devait recevoir des betteraves que pour la 2e fois.

La culture avait été distribuée à l'aide d'un semoir combiné en même temps que les graines de betteraves; elle se trouvait donc localisée dans des sillons espacés de 45 cent. l'un de l'autre.

Nos prévisions se sont trouvées assez bien réalisées. Dans la parcelle non traitée, l'infection spontanée n'a atteint que 2 0/0. Dans les parcelles traitées, la proportion des insectes infectés allait en augmentant assez régulièrement avec la quantité de culture distribuée. Dans certaines parties du champ, la proportion des infectés était de 50 0/0.

Nous aurions certainement obtenu des différences beaucoup plus sensibles entre les différentes parcelles si, au lieu de semer l'oospora en sillons avec les graines, nous l'avions distribuée à la volée au moment des labours.

C'est de cette façon que nous avons procédé au printemps de cette année en distribuant environ 10 kilog de cultures d'oospora par hectare sur la moitié d'un champ de betteraves de 47 hectares.

Les résultats de cet essai ne seront appréciables qu'en octobre.

Mais, en admettant qu'une introduction dans la terre de 10 kilogr. de nos cultures par hectare n'augmentera pas plus de 30 0/0 la proportion des insectes contaminés, le traitement serait déjà très profitable, non seulement par ses résultats immédiats en détruisant un certain nombre de larves qui vivent aux dépens des racines, mais surtout parce qu'il enrichit le champ en

entomophytes autant que 5 ou 6 passages de betteraves.

L'introduction dans la terre d'une quantité convenable de cultures artificielles d'oospora produira donc dans un champ le même effet que 25 à 30 années de culture.

La généralisation de ce procédé dans toute la région envahie actuellement par les *cleonus* amènerait certainement une diminution notable de la quantité de ces insectes dans l'espace de 5 à 6 ans, c'est-à-dire quand tous les champs destinés à la culture des betteraves auraient reçu le traitement que nous venons d'indiquer.

ERRATA

Dans l'article de M. Marino, intitulé : « Non-existence des neutrophiles d'Ehrlich » et inséré dans ce volume, faire les corrections suivantes :

Page 357, ligne 9, lire *acides* au lieu de *avides*.

Page 359, ligne 6, supprimer *certaines*.

Page 362, ligne 30, lire d'*Holothuria* au lieu d'*Holotheuria*.

Page 363, ligne 3, lire *pour les couleurs basiques* (*basophiles*), au lieu de *pour les couleurs* (basiques basophiles).

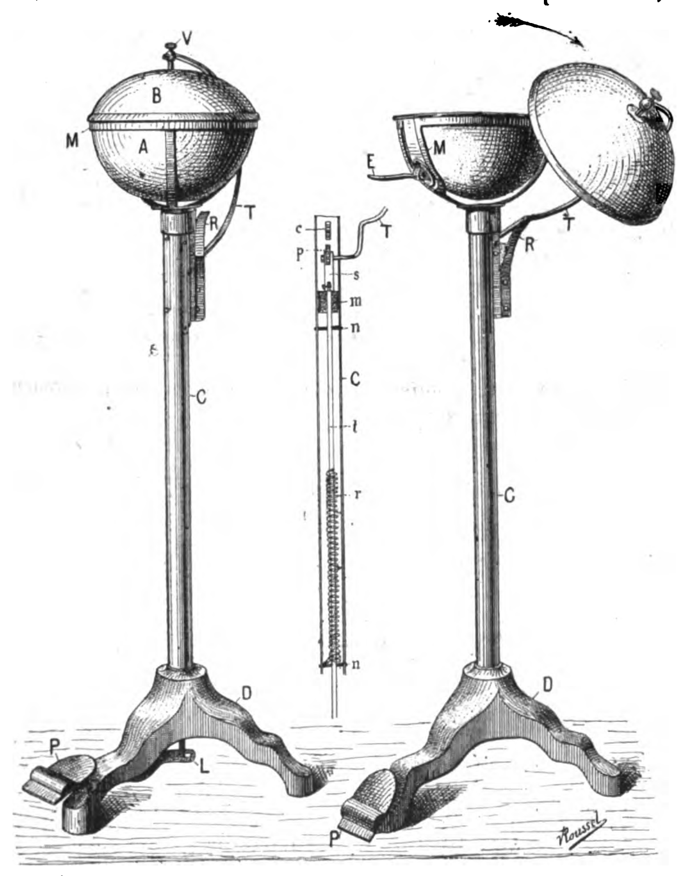
Page 363, ligne 30, lire *retenaient toujours les couleurs acides* au lieu de *retenaient toujours les couleurs décrites par*.

CRACHOIR STÉRILISABLE A FERMETURE AUTOMATIQUE

PAR M. ALEXANDRE FOURNIER.

Aide à l'Institut Pasteur.

Les hygiénistes qui se sont occupés de la propagation de la tuberculose par les crachats ont toujours cherché un système de crachoir facilement stérilisable. La solution du problème, sim-



ple au premier abord, devenait très difficile dans son application; le système adopté devait non seulement être irréprochable au point de vue hygiénique, mais étant mis à l'usage du public, il devait se présenter d'une façon agréable à la vue.

La première idée fut d'employer un récipient à double fond dans lequel les crachats venaient se perdre au milieu d'un liquide antiseptique.

D'autres constructeurs adoptèrent un couvercle articulé avec le corps du crachoir, au moyen d'une charnière. Ces deux systèmes se sont montré défectueux dans leur usage.

Nous venons de construire un modèle, qui sous le rapport hygiénique et esthétique paraît ne rien laisser à désirer. L'appareil se compose d'une cuvette A en faience émaillée. Ce récipient est soutenu dans une monture M, en acier nickelé, supportée par une colonne C, en même métal. La cuvette est fermée par un couvercle métallique B, pouvant s'ouvrir au moyen d'un mécanisme simple actionné par une pédale P.

Quand on fait une légère pression avec le pied, sur la pédale P, celle-ci actionne un levier L qui soulève une tige *t* dissimulée dans la colonne C. Cette tige *t* porte à son extrémité la pièce T, qui soutient le couvercle B.

A la base de la pièce T se trouve une roue dentée *p* qui engrène avec une crémaillère fixe *c*, lorsque la tige *t* arrive au haut de sa course. La roue dentée tourne alors autour de son axe et la pièce T est rejetée sur le côté de l'appareil, entraînant avec elle le couvercle, ainsi que le montre la figure. A ce moment la cuvette est complètement découverte, le couvercle B étant tout à fait séparé du corps du crachoir.

Lorsqu'on fait cesser la pression sur la pédale P, le ressort R repousse la pièce T vers sa position primitive, tandis que le ressort *r*, dissimulé dans la colonne C, attire la tige *t* vers le sol ; le couvercle reprend alors sa première position et le crachoir se trouve complètement fermé.

Le nettoyage et la désinfection du crachoir se font très facilement : deux poignées E placées des deux côtés de la cuvette permettent de l'enlever aisément de sa monture métallique. Le couvercle B peut être lui-même désarticulé, grâce à la vis V, afin d'être nettoyé et stérilisé.

Cet appareil paraît résoudre le problème, en répondant à toutes ses données hygiéniques et esthétiques.

Le Gérant : G. MASSON.

Sceaux. — Imprimerie Charaire.



17me ANNÉE JUILLET 1903 No 6

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

QUELQUES OBSERVATIONS SUR LE ROLE DES AMIBOCYTES
dans le coelome d'un annélide.

PAR MICHEL SIEDLECKI, DE CRACOVIE

Au cours de nos recherches sur les parasites d'un annélide marin, *Polymnia nebulosa* Mont., provenant de Naples et de Trieste, nous avons eu l'occasion d'étudier les amibocytes de la cavité générale de ce ver; pendant notre séjour à la station zoologique de Wimereux, nous avons contrôlé nos recherches antérieures et nous avons établi expérimentalement quelques particularités du rôle des cellules en question dans l'organisme de l'annélide.

Nos observations ont été faites sur le vivant et sur les préparations fixées et colorées : frottis faits avec le liquide cœlomique étalé sur lamelles, coupes à travers le corps des Polymnies, ou bien à travers le liquide coelomique retiré de la cavité géné rale et fixé à part. Comme fixateurs, nous avons employé surtout les liquides de *Flemming*, d'*Hermann* et la solution concentrée de sublimé à laquelle on ajoute 1 0/0 d'acide acétique. Nous avons coloré les préparations avec l'hémalun de Mayer, l'hématoxyline au fer, le mélange d'Ehrlich-Biondi ou la safranine [1].

I

On sait que les amibocytes qui flottent librement dans la cavité du corps des annélides se présentent, à l'état de repos, sous l'aspect de cellules fusiformes un peu aplaties. Le fait a été bien observé déjà par *Kükenthal* [2] et, depuis, par plusieurs auteurs. Chez la

1. Les particularités des méthodes dont nous nous sommes servi seront indiquées dans notre travail définitif sur les parasites des Polymnies.
2. KUKENTHAL W. Ueber, die lymphoïden Zellen der Anncliden, *Jen. Zeitschr. Naturw.*, t. XVIII.

Polymnie, la longueur des amibocytes à l'état fusiforme est de 20 à 30 μ, leur largeur est de 6 μ environ. A la surface de leur corps, on voit une fine striation longitudinale qui semble être seulement un effet de plissement de la surface. Leur protoplasme est très transparent et il forme deux couches assez distinctes (fig. 1); une, plus dense et plus granulée, qui occupe le centre de l'amibocyte, une autre très transparente, qui forme sa surface (fig. 1). Les deux couches sont très bien comparables à l'endoplasme et l'ectoplasme des amibes. Le noyau est bien visible à l'état frais; il apparaît comme une tache claire au centre de l'endoplasme. Sur les préparations fixées (fig. 4 et 8), les stades fusiformes se conservent très bien, à condition que le liquide coelomique ait été fixé très rapidement. Les deux couches du protoplasme ne sont pourtant pas aussi bien visibles qu'à l'état frais.

Le protoplasme semble être formé d'un réseau de fibrilles très fines, et seulement un peu plus compact au centre de la cellule qu'à la surface. Aux nœuds du réseau, on reconnaît les petits grains plasmiques. Sur les préparations colorées à l'hématoxyline au fer, nous avons vu souvent près du noyau un où deux petits grains, ayant l'aspect des centrosomes (fig. 3); mais, comme nous n'avons jamais observé de radiations plasmiques autour de ces grains, il est possible que ce soient des formations accidentelles ressemblant seulement aux centrosomes. Le noyau (fig. 3, 4, 11, 18) fixé et coloré montre un réseau chromatique bien distinct; le nucléole n'est pas toujours visible; souvent un gros grain de chromatine situé au milieu du noyau prend l'aspect d'un vrai nucléole.

Chez la Polymnie, ainsi que chez les autres annélides, les stades fusiformes des amibocytes ne sont visibles que seulement quelques instants après qu'on a retiré le liquide cœlomique du corps de l'animal. Placés sur une lame porte-objet, ils changent leur forme en quelques minutes, parfois même au bout de quelques secondes. Ils s'accollent à la surface de la lame, se raccourcissent et s'aplatissent en même temps, et commencent à pousser des pseudopodes aux deux extrémités allongées. Les pseudopodes sont formés seulement d'ectoplasme, qui paraît tout à fait homogène et hyalin; ils poussent lentement de la surface de la cellule, prennent l'aspect digitiforme, se cour-

bent et recourbent lentement. Parfois deux prolongements situés l'un près de l'autre se touchent et se confondent pour en former un plus gros et plus aplati. Sur la fig. 2, nous avons dessiné les stades successifs du mouvement à des intervalles de 1 1/2 à 2 minutes. *Deckhuysen*[1], qui a observé les mouvements semblables des amibocytes des Arénicoles, propose pour ce mode de mouvement le nom de « ptéropodose », à cause de la forme un peu aplatie des pseudopodes (*Pteropodien*). Sur les préparations fixées, ces prolongements amiboïdes prennent un aspect filiforme, à cause d'une contraction légère due à l'action des réactifs (fig. 3, 4, 12).

On trouve aussi dans la cavité du corps des annélides les stades amiboïdes à côté des fusiformes; amiboïdes sont toujours les cellules qui touchent un corps étranger dans la cavité du corps.

Le changement de forme des amibocytes est, chez la Polymnie, le plus souvent accompagné de l'agglutination de ces cellules; ce phénomène conduit à la formation d'amas à apparence granuleuse, de la surface desquels partent de longs pseudopodes.

Une coupe (fig. 5) à travers un amas pareil nous montre que les cellules conservent leur individualité et s'unissent seulement par leurs prolongements. Le rapprochement des amibocytes conduit ici à la formation d'amas comparables aux réunions plastogamiques des Rhizopodes (*R. Hertwig*[2], *Rhumbler*[3]). Les cellules agglutinées ne sont pas destinées à mourir, comme le croit *Deckhuysen*[4].

Elles vivent dans les préparations fraîches aussi longtemps que les cellules libres, et semblent conserver toutes leurs qualités; comme nous le verrons plus loin, elles peuvent même accomplir ainsi réunies quelques fonctions vitales, surtout la nutrition.

Le phénomène de l'agglutination qui était observé par plusieurs auteurs sur les amibocytes des divers animaux (*Küken-*

1. Deckhuysen M. C., Ueber die Thrombocyten (Blutplättchen). *Anat. Anz. XIX.*
2. R. Hertwig., Ueber Microgromia socialis, eine Colonienbildende Monothalamie. *Arch. f. mikr. Anat.* T. X, Suppl.
3. Rhumbler L., Zell-leib-Schalen und Kernverschmelzungen bei den Rhizopoden. *Biol. Centralblt.*, t. XVIII.
4. Deckhuysen, *l. c.*

thal[1], *Cuénot*[2], *Deckhuysen*, *Geddes*[3], *Schneider*[4] et beaucoup d'autres[5]) est, à notre avis, provoqué en première ligne par la viscosité de la surface des amibocytes. On pourrait supposer qu'il existe aussi une sorte de « cytotropisme » (*W. Roux*, *Rhumbler*) qui provoque le rapprochement des cellules, mais les preuves indiscutables de l'existence d'un tropisme pareil nous manquent. La viscosité est, au contraire, très facile à constater; on voit que les amibocytes s'accolent très facilement à des objets étrangers; à leur surface, se fixent aussi très facilement les grains de carmin injecté dans le coelome (fig. 6). Le fait qu'ils ne s'accolent pas aux autres cellules (par exemple aux œufs) qui se trouvent souvent dans la cavité générale du corps des Polymnies, s'explique facilement par la différence des tensions de la surface des amibocytes et des autres cellules; cette différence doit être minimale entre les amibocytes mêmes, et c'est grâce à cette circonstance que les amibocytes peuvent parfois se confondre complètement.

II

Il est bien connu depuis longtemps que les amibocytes ont la propriété d'englober divers corps étrangers qui se trouvent dans le coelome. Chez la Polymnie, les phénomènes de la phagocytose présentent quelques particularités bien intéressantes, qui jettent une lumière sur leur rôle dans l'organisme de ces vers.

Comme tous les phagocytes, les amibocytes des Polymnies sont capables d'englober les poudres inertes, p. e. le carmin, qu'on injecte dans la cavité générale des animaux; il nous a été possible d'observer *de visu* ce phénomène. Nous avons injecté du carmin broyé avec de l'eau physiologique sous la peau de la Polymnie, tout en faisant attention de ne blesser ni l'intestin ni le vaisseau dorsal de l'animal, et, 5 minutes après, nous avons

1. KUKENTHAL, *l. c.*
2. CUÉNOT L., *a)* Étude physiologique sur les Orthoptères. *Arch. de Biol.* T. XIV. *b)* Études sur le sang et les glandes lymphatiques dans la série animale. *Arch. Zool. exp. et gén.* (2e série) T. IX. *c)* Les globules sanguins et les organes lymphoïdes des invertébrés. *Arch. d'An. micr.* T. I.
3. GEDDES P., On the coalescence of ameboid cells into plasmodia and on the so called coagulation of invertebrate fluids. *Proc. roy. Soc. London*, 1880.
4. SCHNEIDER G., Uber phagocytäreorgane und Chloragogenzellen der Oligochaeten. *Zeitschr. f. wiss. Zoologie.* T. LXI.
5. Voir la revue par J. CANTACUZÈNE dans l'*Année biologique*. T. II, 1896 (avec préface de E. METCHNIKOFF).

retiré une goutte du liquide coelomique pour l'observer à l'état frais. On voit bien que le carmin s'accole d'abord à la surface des amibocytes, puis il est entouré par les prolongements, et transporté dans l'intérieur de la cellule.

Il se trouve d'abord dans l'ectoplasme (fig. 7 et 10), mais bientôt il est transporté dans l'endoplasme et placé près du noyau (fig. 8 et 9). Les cellules englobent souvent une telle quantité de carmin, qu'elles se remplissent complètement avec (fig. 9). On peut très facilement retrouver tous les stades de l'englobement sur les frottis faits avec le liquide coelomique retiré d'une Polymnie injectée avec du carmin.

Les boules de carmin trop grandes pour être englobées par un phagocyte (fig. 13) sont entourées d'un très grand nombre d'amibocytes qui s'appliquent à leur surface l'un à côté de l'autre et peuvent même confondre leurs bords. La grosse boule de carmin semble alors être plongée dans une masse plasmique granuleuse, de la surface de laquelle sortent les pseudopodes hyalins; il est très difficile de retrouver çà et là les contours des amibocytes accolés. Cette union, qui a pour but l'englobement d'un corps de dimensions considérables, peut être comparée avec la formation des agglomérations de Rhizopodes que *Lang* appelle « Fressgesellschaft ». Les cas d'une union pareille ont été observés aussi par *G. Schneider* sur les amibocytes des *Perichaeta* auxquels on a injecté du sang de souris; cet auteur pense pourtant qu'il n'y a pas fusion des amibocytes entourant un gros morceau de sang coagulé. La voracité des amibocytes de la Polymnie est telle que ce ne sont pas seulement les individus à protoplasme vide qui se remplissent avec du carmin, mais aussi les cellules déjà bourrées d'autres inclusions (fig. 10).

Grâce à cette voracité, les amibocytes jouent un rôle important dans la lutte de l'organisme contre les parasites et dans certains phénomènes de développement des produits sexués.

III

Dans le corps de la Polymnie, vivent plusieurs parasites; nous avons[1], dans nos communications antérieures, signalé déjà l'existence d'un infusoire cœlomique, *Herpetophrya astoma*, et

1. M. Siedlecki, *a*) *Herpetophrya astoma* n. g. n. sp., infusoire parasite des Polymnies, *Bull. intern. de l'Ac. des Sc. de Cracovie*, 1902. *b*) Cycle évolutif de *Caryotropha Mesnili*, coccidie nouvelle des Polymnies. *Ibidem*.

d'une coccidie vivant aussi dans la cavité générale : *Caryotropha Mesnili*. Ajoutons encore que, dans l'intestin de la polymnie, vivent deux grégarines : une appartenant au genre *Doliocystis*, l'autre au genre *Selenidium*[1]. Cette dernière se trouve très rarement aussi dans le coelome de l'annédide. De tous ces parasites, seule la coccidie est soumise aux attaques des phagocytes. L'infusoire et la grégarine échappent à la voracité de ces cellules, grâce à leurs mouvements vigoureux et rapides; c'est un fait de même ordre que celui signalé par *Léger*[2] pour le *Lithocystis Schneideri*.

La coccidie des Polymnies se développe, comme nous l'avons déjà décrit ailleurs, dans les spermatogonies de cet annélide. Elle provoque, pendant son accroissement, une hypertrophie considérable des cellules hôtes; elle peut atteindre une grandeur remarquable et se reproduire d'une façon asexuée, toujours enfermée dans le protoplasme de la cellule hypertrophiée. Or, dans ces stades de sa vie intracellulaire, *Caryotropha mesnili* n'est jamais touchée par les phagocytes. Il en est de même des cellules infectées. C'est d'ailleurs facile à comprendre : l'hypertrophie des cellules se produit par suite d'une surexcitation de leurs fonctions vitales; les cellules hypertrophiées doivent alors être encore plus réfractaires à l'action des phagocytes que les intactes, et c'est pour cela qu'elles protègent si bien les parasites. Mais, à un moment donné, certains exemplaires de *Caryotropha* se transforment en individus femelles ou *Macrogamètes* et ils quittent les cellules hôtes pour accomplir l'acte de la copulation dans la cavité du corps de l'annélide. Dès ces stades, commencent les attaques des phagocytes. Les coccidies, maintenant au stade d'ookystes pourvus d'une membrane épaisse, sont entourées de tous les côtés par les amibocytes. Ces derniers s'appliquent fortement à la surface des parasites et s'y aplatissent; les phagocytes voisins se touchent, s'unissent avec leurs prolongements amiboïdes et forment ensemble une couche épithélioïde. Sur la première couche, s'en déposent bientôt plusieurs autres, et les prolongements des cellules superposées se mêlent

1. Cette grégarine a une forme très particulière : sa surface est marquée suivant sa longueur avec des sillons très profonds, de sorte que, sur une coupe transversale, la grégarine se présente sous la forme d'une étoile à 7 rayons. Nous proposons pour cette forme le nom de *Selenidium costatum*.

2. Léger L., Contribution à la connaissance des Sporozoaires parasites des Echinodermes, *Bull. sc. de la France et de la Belg.* T. XXX.

(fig. 14) et se confondent; enfin, le kyste du parasite se trouve enfermé dans un amas d'amibocytes liés si fortement entre eux qu'on pourrait même parler d'un syncytium. Nous nous trouvons alors en présence d'une réaction cellulaire absolument semblable à celle qui se produit autour des grands corps inertes, p. e. autour des grosses boules formées de grains de carmin; il y a ici une union plastogamique de plusieurs cellules pour englober un corps trop gros pour une seule. A la formation d'un syncytium pareil, prennent part tous les amibocytes qui se trouvent au voisinage de la coccidie; même ceux qui ont déjà englobé autre chose s'attachent à la surface des plasmodes autour des ookystes.

Malgré leurs membranes épaisses et résistantes, les ookystes peuvent être détruits par les phagocytes. On rencontre souvent dans la cavité du corps des Polymnies des agglomérations de phagocytes qui entourent les ookystes en voie de destruction ou bien les sporocystes.

Nous avons représenté (fig. 15) une coupe à travers une agglomération pareille. La disposition des phagocytes montre bien qu'il s'agit ici des restes d'un ookyste détruit. Une couche des amibocytes aplatis et épithélioïdes, se colorant un peu plus fortement que le reste, permet encore de reconnaître les limites de la membrane de l'ookyste récemment disparue. Au centre, on voit un syncytium formé de phagocytes qui ont pénétré dans l'intérieur de l'ookyste où sont plongés deux sporocystes déjà mutilés et ayant leur membrane plissée, mais renfermant encore quelques sporozoïtes pas mûrs; un morceau de la membrane du troisième sporocyste se trouve à côté. Quelques phagocytes accolés aux sporocystes commencent à détruire ces derniers.

On peut s'expliquer une réaction si énergique des amibocytes envers les kystes des coccidies par deux raisons : 1° les ookystes se comportent comme les corps étrangers dans le coelome, et 2° on peut penser qu'il se produit des substances quelconques dans les ookystes qui agissent par chimiotaxie sur les phagocytes et les attirent.

La destruction des kystes coccidiens par les phagocytes présente un cas de la défense de l'organisme contre le parasite; les avantages que l'organisme tire d'une défense si effective sont évidents : le nombre des parasites est diminué, or la possibilité d'une infection est moindre

Il est nécessaire d'ajouter que tous les kystes de *Caryotropha* qui se trouvent libres dans le coelome des Polymnies sont assaillis par les amibocytes. C'est un cas extrêmement rare de rencontrer un kyste un peu avancé en développement tout à fait libre dans le liquide coelomique. Ce sont seulement les stades les plus jeunes des ookystes qu'on trouve parfois dépourvus de la couche des phagocytes; ce sont peut-être des individus qui n'ont pas encore été attaqués, simplement parce qu'ils se trouvent libres depuis peu de temps dans la cavité générale.

Les individus entourés au commencement de leur développement se portent très bien. Il peut même arriver que les sporozoïtes dans les sporocystes se développent presque complètement et tout à fait normalement, malgré que les ookystes sont plongés dans un syncytium phagocytaire. Mais enfin, beaucoup des kystes qui étaient complètement sains au moment où ils sont tombés dans le coelome sont détruits par les phagocytes. Nous croyons donc, contrairement à l'opinion de *Cuénot*, que les phagocytes jouent un rôle très important dans la lutte de l'organisme contre les parasites.

Des faits analogues à ce que nous venons de décrire chez la coccidie des Polymnies ont déjà été vus quelquefois sur les kystes grégariniens. Ainsi, *Cuénot* [1], sur les kystes du *Diplocystis* des grillons, a vu la formation d'une couche ressemblant à « une sorte de tissu conjonctif résultant de la transformation des phagocytes ». Il a reconnu aussi de nombreux kystes détruits dans l'intérieur des masses des phagocytes. Dans son travail plus récent [2], le même auteur pense pourtant que l'action des phagocytes se borne à la destruction des grégarines déjà mortes ou bien des kystes seulement; les formes végétatives vigoureuses des grégarines, d'après *Cuénot*, ne sont pas attaquées par les amibocytes. *Léger* [3], qui a très bien étudié le développement de *Lithocystis Schneideri*, a constaté aussi que les formes mobiles de cette grégarine ne sont pas attaquées par les phagocytes, tandis que des plasmodes épais se forment autour des kystes. Mais *Léger*, avec raison, attribue cette action différente des amibocytes vis-à-vis des divers stades de la même

1. Cuénot L., *l. c.*
2. Cuénot L., Recherches sur l'évolution et la conjugaison des grégarines *Arch. de Biol.* T. XVII.
3. Léger L., *l. c.*

grégarine à la mobilité des uns et à l'inertie des autres; le cas de *Cuénot* pourrait s'expliquer peut-être par la même raison, ainsi que les faits décrits par *Labbé* et *Racovitza*[1]. Au contraire, *Caullery* et *Mesnil*[2] ont constaté une lutte qui s'établit entre une grégarine coelomique de *Dodecaceria concharum*, *Gonospora longissima*, à divers stades de son développement, et les phagocytes. Ceux-ci attaquent la grégarine aussi bien à son état végétatif qu'à l'état de kyste, et la détruisent souvent. La défense de l'organisme par les phagocytes est très effective; les grégarines, enveloppées dans une couche épaisse d'amibocytes, sont dissoutes et digérées; leur noyau même, qui d'ailleurs persiste le plus longtemps, finit par être détruit. *Caullery* et *Mesnil* ont également montré que la pénétration et la croissance du parasite dans le coelome de l'annélide coïncide avec la période d'affaiblissement de l'appareil phagocytaire, (dont les cellules sont bourrées de granulations de réserves); mais, aussitôt que les réserves ont disparu, les phagocytes reprennent leurs propriétés phagocytaires et un grand nombre de grégarines sont détruites. Il faut ajouter que *Gonospora*, à son état végétatif, n'est que peu mobile; cela nous explique pourquoi les amibocytes ne sont pas chassés de sa surface. Les faits constatés par *Léger*, *Caullery* et *Mesnil* et nos observations sur la coccidie des Polymnies nous permettent de croire qu'il n'y a pas de chimiotaxie négative des phagocytes vis-à-vis des grégarines, contrairement à l'opinion de *Cuénot*, lequel prétend qu'elle est une « loi générale » pour la forme végétative des grégarines coelomiques.

IV

Les phénomènes les plus curieux de phagocytose que nous ayons observés dans la cavité générale des annélides se présentent chez les mâles dont les produits génitaux sont en plein développement.

Chez la Polymnie, le développement des spermatozoïdes se fait de la façon suivante : les spermatides entourent comme

1. Labbé et Racovitza. *Pterospora maldaneorum* n. sp., grégarine nouvelle parasite des Maldaniens. *Bull. Soc. zool. France*. T. XXII.

2. Caullery et Mesnil, Les formes épitoques et l'évolution des Cirratuliens. *Annales de l'Univ. de Lyon*. T. XXXIX, 1898.

une couche épithéliale un gros cytophore sphérique; l'ensemble constitue une sorte de morula, qui flotte dans le liquide coelomique. La cellule centrale possède un grand corps plasmique, dans lequel on peut reconnaître un noyau très lâche et se colorant très faiblement. A la fin de la spermatogénèse, il est souvent impossible de discerner bien le noyau du cytophore. A ce stade, les spermatozoïdes sont attachés par leurs têtes à la cellule centrale et leurs parties plasmiques sont hérissées, comme une chevelure, autour de la boule plasmique du cytophore. Finalement, ils se détachent et flottent dans la cavité générale; les cytophores restent libres à côté.

Il arrive souvent que les spermatides se détachent trop tôt du cytophore. Incapables d'évoluer librement, ils deviennent aussitôt la proie des phagocytes. On les voit englobés (fig. 16 à 18) (par une ou par plusieurs) dans les vacuoles des amibocytes où elles subissent la digestion. Parfois on peut reconnaître encore (fig. 17) dans le noyau des cellules englobés le réseau caractéristique; mais, lentement, tout devient compact, le noyau prend l'aspect d'un gros grain chromatique et, à cet état, il résiste assez longtemps à la digestion. La phagocytose, dans ce cas, débarrasse l'organisme de ces cellules inutilisables.

Les spermatozoïdes qui, avant d'être évacués, flottent librement dans la cavité du corps, ne sont pas à l'abri des attaques des phagocytes. On rencontre souvent (fig. 19 et 20) les amibocytes avec des spermatozoïdes englobés, placés dans l'intérieur de petites vacuoles claires. Il est très facile de reconnaître les spermatozoïdes englobés à leur forme caractéristique qu'ils conservent (fig. 19) assez longtemps; même la partie plasmique et la queue sont souvent bien visibles. Au fur et à mesure de la digestion, les parties protoplasmiques des spermatozoïdes disparaissent les premières; la tête se conserve plus longtemps, mais elle perd lentement sa forme allongée (fig. 20 et 21) et se transforme en un gros grain chromatique.

Un phagocyte englobe souvent un très grand nombre de spermatozoïdes; après leur digestion partielle, il apparaît comme bourré de granules formés de chromatine (fig. 21). Ces amibocytes, qui ont englobé une très grande quantité de spermatozoïdes, ont souvent un plus grand noyau (fig. 20 et 21) et un corps plasmique plus volumineux que les vides; leur structure

interne reste pourtant complètement normale. Il est possible que cet accroissement soit en rapport avec une nutrition plus énergique.

La phagocytose des spermatozoïdes peut avoir, à notre avis, une grande signification dans la vie des Polymnies. Il est évident que les spermatozoïdes les moins vigoureux et, par conséquent, les moins mobiles et les moins résistants, sont les plus faciles à englober. Les phagocytes font alors un triage parmi les produits génitaux et laissent intacts seulement les plus sains et les plus forts; ces derniers ont alors le plus de chances d'être évacués et de servir pour la fécondation.

On sait qu'après l'évacuation d'un grand nombre de spermatozoïdes, il reste toujours un excès, non utilisé, dans le coelome de l'annélide; or, l'organisme se débarrasse de cet excès au moyen des phagocytes. Le fait qu'après la période de la maturité sexuelle, on ne retrouve pas du tout de produits génitaux mâles dans le coelome s'explique alors facilement par la phagocytose des spermatozoïdes.

La phagocytose des spermatozoïdes a été déjà observée par *A. Schneider*[1], qui a noté la présence de phagocytes ayant la propriété de détruire les spermatozoïdes et les œufs dans les testicules et les ovaires de *Nephelis Aulostomum* et *Hirudo*. D'après les observations de *Schneider*, les phagocytes entourent les spermatoblastes à divers stades de leur développement, provoquent leur décomposition en plusieurs parties, et englobent les morceaux détachés. On les voit, bourrés de spermatoblastes surtout dans la partie du *Vas deferens* située immédiatement en avant du pénis dans ce dernier, les phagocytes ne se trouvent plus. Dans ce cas, il s'agit de phénomènes très semblables à ceux que nous avons observés chez la Polymnie. Mais, d'après *Schneider*, c'est la phagocytose qui provoque la destruction des produits génitaux; au contraire, chez la Polymnie, le rôle des phagocytes consiste surtout à débarrasser l'organisme des produits génitaux les moins vigoureux ou bien inutilisables.

Les deux cas ont ceci de commun qu'il s'agit de la spermatophagie chez l'individu *même* qui a fournit les spermatozoïdes. Au

1. A. Schneider, Ueber die Aufloesung der Eier und Spermatozoen in den Geschlectsorganen. *Zool. Anz.* T. III, 1880.

contraire, Kowalevsky [1] a constaté la phagocytose des spermatozoïdes introduits pendant la fécondation dans le coelome d'un *autre* individu. Dans ce cas, les amibocytes n'interviennent que très rarement; ce sont les néphridies qui jouent le rôle d'organes phagocytaires. Il est évident que les faits de cet ordre, signalés aussi par *Brandes* [2] et *Brumpt* [3], ne sont pas directement comparables à la spermatophagie constatée chez la Polymnie.

Nous avons dit plus haut qu'après le développement des spermatozoïdes, les masses plasmiques centrales, les cytophores, auxquels ils étaient attachés, restent libres dans la cavité du corps de la Polymnie. Ces restes plasmiques sont phagocytés à leur tour. Les phagocytes s'appliquent à leur surface, s'y aplatissent, et enfin les entourent avec leur protoplasme (fig. 22); souvent, un ou plusieurs spermatozoïdes, non encore détachés de la surface de la masse plasmique, sont englobés avec elle (fig. 22 et 25).

Un cytophore représente un volume assez considérable en comparaison du phagocyte; par conséquent, ce dernier forme souvent seulement une couche très mince autour du cytophore (fig. 22). Une fois plongé dans le corps du phagocyte, le cytophore commence à subir la digestion. Il se trouve placé dans une vacuole claire où son volume diminue lentement; son contour devient un peu irrégulier, souvent il se désagrège en quelques morceaux et sa colorabilité augmente au fur et à mesure de la digestion. Le phagocyte qui contient un cytophore (fig. 23) augmente généralement rapidement de volume, par suite probablement d'une nutrition très énergique. Cette augmentation de volume rend possible aux phagocytes d'englober plusieurs cytophores (fig. 24) successivement; sur des préparations contenant des phagocytes entiers et sur des coupes en série, nous avons compté jusqu'à 7 cytophores à des degrés divers de digestion, dans un même phagocyte très distendu. Il arrive aussi fréquemment que plusieurs phagocytes s'unissent pour englober quelques cytophores (fig. 25).

1. Kowalevsky A., Phénomènes de la fécondation chez l'*Haementeria costata*. *C. R. Acad. Sciences Paris*, t. CXXLX, 1899, p. 261, et *Mém. Acad. Sciences Saint-Pétersbourg.*, 7e série, t. XI, 1901.

2. Brandes G., Die Begattung von Nephelis, *Hall. Zeitschr. fur Naturwis.* T. LXXII, 1899.

3. Brumpt, De la fécondation par voie hypodermique chez les Hirudinées, *Comp. rend. de la Soc. de Biol.*, 1900.

Durant tous ces phénomènes, les noyaux des phagocytes sont rejetés vers la surface ou bien serrés si fortement entre les grands corps englobés, qu'ils se déforment, tout en conservant leur structure (fig. 22, 25).

On rencontre dans le protoplasma des phagocytes qui ont englobé des cytophores, une quantité des granulations diverses (fig. 24). Le nombre de ces granules est très considérable, surtout chez les individus dans lesquels les vacuoles contiennent des restes de cytophores presque entièrement digérés. Deux sortes de grains sont faciles à distinguer; les uns sont incolores et ressemblent aux granules protoplasmiques; les autres, jaunâtres, brunissant fortement sous l'action de l'acide osmique, sont formés d'une matière grasse. Les deux sortes représentent probablement les produits de la digestion des cytophores dans les phagocytes.

La phagocytose des cytophores présente un grand avantage pour l'organisme de la Polymnie. Il est évident que la formation des spermatozoïdes sur les cytophores se fait avec une dépense énorme de matière. A notre avis, la phagocytose règle et modère ces dépenses; les substances qui forment les cytophores ne sont pas perdues pour l'annélide, alors qu'elles sont englobées; au contraire, elles restent dans l'organisme en se transformant. Grâce aux réactions phagocytaires, les pertes matérielles de l'organisme, pendant la spermatogénèse, sont réduites au minimum. La phagocytose est en ce cas une fonction régulatrice d'une très haute importance.

EXPLICATION DES PLANCHES VIII ET IX

Les figures 1, 2, 6 à 10 et 13 sont dessinées d'après le vivant, les autres d'après des préparations fixées. A l'exception des fig. 14 et 15, toutes les autres ont été dessinées à un grossissement de 750 diamètres.

Fig. 1. Amibocyte fusiforme, section optique.

Fig. 2. Huit stades successifs d'un amibocyte en mouvement, dessinés à des intervalles de 2 minutes.

Fig. 3. Trois amibocytes fixés au sublimé, colorés à l'hématoxyline au fer. Dans deux, on voit un grain noir ressemblant à un centrosome.

Fig. 4. Trois amibocytes fixés au liquide d'Hermann, col. safranine.

Fig. 5. Coupe à travers une agglomération d'amibocytes. Dans trois cellules, on voit les cytophores englobés. Fix. au Flemming, col. safranine.

Fig. 6. Amibocyte vivant, avec grains de carmin à la surface.

Fig. 7-9. Englobement du carmin par les amibocytes.

Fig. 10. Amibocyte bourré de vacuoles et contenant un grain de carmin.

Fig. 11. Amibocyte fusiforme avec carmin. Frottis fixé au sublimé 12 heures après l'injection du carmin dans le coelome; hématoxyline.

Fig. 12. Amibocyte avec carmin, fixé 12 heures après l'injection. Sublimé, hématoxyline.

Fig. 13. Une grosse boule de carmin entourée d'amibocytes.

Fig. 14. Un kyste de *Caryotropha mesnili* entouré d'amibocytes. Liquide d'Hermann, safranine. Grossissement 520.

Fig. 15. Une agglomération d'amibocytes entourant un kyste détruit de *Caryotropha mesnili*. * Limites de l'ookyste marqués par une couche d'amibocytes plus foncés. + Un amibocyte ayant englobé plusieurs spermatides. Liquide de Hermann, safranine. Grossissement 520.

Fig. 16. Amibocyte avec une spermatide englobée. Sublimé, hématoxyline.

Fig. 17. Amibocyte avec 5 spermatides englobées, dont le réseau chromatique conserve encore la structure caractéristique. Coloration comme 16.

Fig. 18. Trois amibocytes; dans l'un, quelques spermatides en voie de digestion. Liquide de Hermann ; safranine.

Fig. 19. Amibocyte avec 3 spermatozoïdes englobés. Les parties plasmiques des spermatozoïdes sont encore bien conservées. Sublimé; hémalun.

Fig. 20. Un grand amibocyte avec plusieurs spermatozoïdes en partie digérés. Sublimé, hémalun.

Fig. 21. Deux amibocytes avec gros grains de chromatine, représentant les têtes transformées des spermatozoïdes. Sublimé, hémalun.

Fig. 22. Amibocyte avec un cytophore englobé. Sur le cytophore, une tête de spermatozoïde accolée. Liqueur de Hermann, safranine.

Fig. 23. Un très grand amibocyte avec un cytophore. Sublimé, hémalun.

Fig. 24. Amibocyte avec trois cytophores digérés et très nombreuses granulations dans le protoplasme. Liquide de Hermann, safranine.

Fig. 25. Deux amibocytes unis, avec trois cytophores et une spermatide englobés. * Un cytophore avec des restes de spermatozoïdes. Un noyau déformé par suite de la pression. Liqueur de Hermann, safranine.

CONTRIBUTION A L'ÉTIOLOGIE DE LA DYSENTERIE

LA DYSENTERIE ÉPIDÉMIQUE

Par MM.

L. VAILLARD, médecin principal de l'armée

et

CH. DOPTER, médecin-major de 2e classe.

La dysenterie compte parmi les maladies les plus fréquentes et parfois les plus meurtrières de l'espèce humaine. Commune dans les pays tempérés, où elle se manifeste par des épidémies remarquablement saisonnières, invariablement attachée aux armées en campagne au point de devenir le constant fléau de toutes les guerres continentales, elle acquiert plus d'importance encore dans les contrées chaudes du globe et, avec la malaria, constitue la maladie dominante de ces régions. Un grand intérêt s'attache donc au progrès de nos connaissances sur une affection si répandue.

I

On a pensé pendant longtemps que la dysenterie n'était pas de nature univoque dans toute l'étendue de son aire géographique; aussi distinguait-on à ce point de vue la dysenterie tropicale de celle des pays tempérés. Après les travaux de L. Colin, de Kelsch et Kiener, il apparut que la dysenterie se traduisait en tout lieu par des lésions, une évolution clinique, des conditions étiologiques semblables, et, en France du moins, on se prit à considérer comme absolue l'unité de ses manifestations sous les diverses latitudes. Aujourd'hui cette croyance unitaire fléchit partout, et la maladie tend à se démembrer en espèces distinctes par leur cause pathogène et les altérations qui les caractérisent.

Deux formes nettement tranchées se dégagent jusqu'ici.

La première appartient d'une manière plus spéciale aux pays chauds; elle y est endémique, s'observe à toutes les périodes de l'année et donne fréquemment lieu à la suppura-

tion du foie. Son évolution clinique est irrégulière, entrecoupée d'accalmies et d'exacerbations, souvent prolongée ou chronique. Ses lésions, bien décrites par Councilmann et Lafleur, Kruse et Pasquale, Harris, se résument essentiellement en une tuméfaction des diverses tuniques du gros intestin, avec foyers de nécrose étendus d'emblée à toute l'épaisseur de la muqueuse, abcès folliculaires, ulcères déchiquetés et profonds à bords surplombants. C'est à propos d'une telle forme observée en Égypte que Koch (1883), puis Kartulis (1886) ont mentionné l'existence dans l'intestin et le foie abcédé des amibes spéciales décrites par Lösch en 1875; l'un et l'autre n'hésitèrent pas à considérer ces amibes comme la cause efficiente de la maladie. Cette conception paraît aujourd'hui bien justifiée; déjà étayée par les travaux successifs de Osler, Councilmann et Lafleur, Kruse et Pasquale, Marchoux, etc., elle trouve une nouvelle confirmation dans les recherches de Strong et Musgrave[1] à Manille, et celles de Jurgens[2] sur la dysenterie des soldats allemands rapatriés de Chine. Il en ressort en effet que, partout où on l'observe, cette dysenterie s'individualise par la présence d'amibes spéciales dans les déjections fraîches des malades et les lésions intestinales de ceux qui succombent; le pus et la paroi des abcès du foie les contiennent également. L'inoculation au chat (voie rectale) des selles dysentériques ou du pus hépatique renfermant les protozoaires détermine une maladie mortelle, semblable par ses symptômes et ses lésions à celle de l'homme. Les selles empruntées à d'autres formes de dysenterie ne montrent jamais les mêmes amibes, et leur injection dans le rectum du chat reste toujours sans effet. Il semble donc bien que la dysenterie exotique, si fréquemment accompagnée d'hépatite suppurée, soit imputable à l'action d'amibes particulières qui se localisent surtout dans le gros intestin, mais peuvent aussi gagner le foie et en provoquer la suppuration. C'est la *dysenterie amibienne.*

A côté de cette forme, une autre commence à s'édifier qui se distingue de la précédente par ses caractères épidémiologiques, cliniques, anatomiques et surtout la nature de sa cause :

1. Strong et Musgrave, *Report of the etiology of the dysenteries of Manila; Report of the surgeon-general of the army, Washington,* 1900.

2. Jurgens, *Veroffentlichungen aus dem Gebiete des Militar-Sanitatswesens.* Heft XX, 1902.

elle est l'apanage des pays européens ou, plus exactement, des régions tempérées, sans toutefois faire défaut dans les zones chaudes et tropicales. Exceptionnellement sporadique, cette dysenterie se traduit par des épidémies dont l'extension et la gravité sont souvent redoutables. Dans l'immense majorité des cas, son règne coïncide strictement avec la période la plus chaude de l'année : c'est de juillet à la fin septembre que les épidémies commencent et achèvent leur évolution. La maladie est transmissible, parfois même très contagieuse. Le début en est généralement brusque, la marche aiguë, rapide, courte et régulière ; la guérison ou la mort surviennent d'habitude en l'espace de deux septénaires ; parfois cependant les atteintes sont traînantes et peuvent durer des mois. Les lésions qui lui sont propres s'étendent de l'anus au cœcum et jusqu'à la portion terminale de l'iléon, intéressant surtout la muqueuse proprement dite. Elles se caractérisent par la tuméfaction œdémateuse et hypérémique de cette membrane, qui revêt l'apparence d'un velours mamelonné, de coloration rouge sombre, par l'hypersécrétion catarrhale des glandes de Lieberkuhn et des foyers de nécrose superficielle ; cette nécrose débute par l'épithélium de revêtement, gagne ensuite de proche en proche, donnant lieu à des taches jaunâtres ou grisâtres légèrement déprimées. L'élimination des eschares laisse des exulcérations ou des pertes de substance, à fond et à bords plats, de contours irréguliers qui n'atteignent presque jamais la *muscularis mucosæ*. C'est le type de l'inflammation *diphtéroïde* des Allemands. Une telle dysenterie ne s'accompagne jamais d'abcès du foie. Les selles muco-sanglantes ne renferment pas les amibes précédemment signalées, et leur inoculation dans le rectum des chats ne provoque aucune réaction appréciable.

L'étiologie de cette dysenterie a donné lieu à des travaux nombreux. La plupart visent des bactéries certainement étrangères au développement de la maladie. Mais les recherches de ces dernières années ont appelé l'attention sur un bacille particulier, que beaucoup considèrent déjà comme la véritable cause de la dysenterie épidémique ; celle-ci deviendrait dès lors, par opposition à la forme précédente, une *dysenterie bacillaire*.

C'est exclusivement à cette dysenterie *épidémique*, *bacillaire* que s'adressent les développements qui vont suivre.

II

L'agent pathogène de cette dysenterie a été vu pour la première fois par Chantemesse et Widal qui, dans une courte note présentée à l'Académie de médecine en 1888[1], ont sommairement défini ses caractères à l'aide des moyens dont la science disposait à cette époque, et fait ressortir son action pathogène sur les animaux. Il y a lieu de croire que, ultérieurement, Kruse et Pasquale[2] (1894), Celli et Fiocca[3] (1895) ont rencontré le même microbe; du moins signalent-ils dans les selles l'existence commune d'un bacille ressemblant à celui de la fièvre typhoïde. Mais c'est à Shiga[4] (1898) que revient le mérite d'avoir bien différencié le bacille particulier qu'il trouvait dans la dysenterie épidémique du Japon, et fourni une première preuve de sa spécificité en démontrant l'agglutination de ses cultures par le seul sérum sanguin des sujets affectés de la maladie. Ses expériences sur les animaux (souris, cobayes, lapins, chats, chiens) n'ont pu reproduire les symptômes et les altérations intestinales de la dysenterie humaine; tout au plus Shiga obtenait-il du catarrhe, de l'hypérémie et des hémorragies circonscrites de la muqueuse. C'est donc en se basant sur la présence constante du bacille chez les dysentériques, son absence dans les déjections des autres malades, son agglutination par le sérum des sujets atteints ou récemment affectés, qu'il a cru pouvoir le considérer comme la cause probable de la dysenterie épidémique, celle du moins qui règne au Japon.

Le bacille dysentérique décrit par Shiga est un bâtonnet court, à bouts arrondis, à peine mobile, dépourvu de spores, non colorable par la méthode de Gram. Il se développe sur la gélatine sans la liquéfier : ses colonies d'abord punctiformes, légèrement jaunes et granulées, s'élargissent ensuite en prenant un aspect folié, et montrent alors un centre foncé avec une périphérie claire, translucide; inoculé par piqûre, il forme un cordon blanchâtre le long de la strie d'inoculation. En gélose, les colo-

1. Chantemesse et Widal, Sur le microbe de la dysenterie, *Bulletin de l'Acad. de Méd.*, 1888.
2. Kruse et Pasquale, Unters. über Dys. *Zeitsch. f. Hyg.*, 1894.
3. Celli et Fiocca, *Ann. dell' Inst d'igiena Sper. di Roma*, 1895.
4. Shiga, *Centr. f. Bakt.*, 1898, Ueber den Erreger der Dysent. in Japon.

nies offrent un aspect humide, blanc bleuâtre, un peu foncé au centre, transparent à la périphérie. Sur pomme de terre il donne un glacis luisant, à peine visible, qui s'épaissit un peu et se fonce par la suite. Il ne coagule pas le lait, communique au lait tournesolé une légère teinte rougeâtre dans les premières 24 heures, ne fait pas fermenter les sucres et ne produit jamais d'indol. Par l'ensemble de ses caractères, ce bacille, ainsi que l'a fait remarquer Shiga, se rapproche donc du bacille typhique.

Deux ans plus tard (1900), Kruse[1] décrit minutieusement un bacille semblable dans une épidémie dysentérique qui sévissait en Westphalie rhénane; comme Shiga, il s'appuie sur l'agglutination de ce bacille par le sérum des dysentériques, et seulement par ce sérum, pour en admettre la spécificité. Kruse établissait ainsi que la dysenterie allemande se superpose à la dysenterie japonaise.

Dès ce moment, les recherches confirmatives se multiplient. Flexner[2] aux Philippines, puis à Porto-Rico, isole de certains dysentériques un bacille qui, sauf des variantes sans importance, s'identifie avec celui de Shiga.

Strong et Musgrave[3], dans une excellente étude sur la dysenterie des troupes américaines à Manille, établissent la coexistence de deux formes bien distinctes de la maladie. L'une, endémique, souvent accompagnée d'abcès du foie, se lie à la présence d'amibes spéciales dans le gros intestin et les selles : on n'y trouve pas le bacille de Shiga et le sang des malades n'agglutine pas les cultures de ce dernier; elle peut être reproduite expérimentalement chez le chat par l'injection rectale des selles à amibes. L'autre, épidémique, saisonnière, ne déterminant jamais de suppuration hépatique, se caractérise par la présence constante dans les selles et les parois intestinales d'un bacille spécial que le sérum des malades agglutine. Cette dysenterie paraît la plus fréquente[4]. La description du bacille qui la provoque ne laisse aucun doute sur sa ressemblance avec celui de

1. Kruse, Die Ruhrgefahr in Deutschland in besondere un rheinisch-Westfälischen Industriebezirk, *Centr. f. allg. Gesundheitspflege*, 1900; Über die Ruhr als Volkskrankheit und ihren Erreger. *Deutsch. Med. Woch.*, 1900; etc.

2. Flexner, The etiology of tropical dysentery, *Centr. f. Bakt.* 1900.

3. Strong et Musgrave, *Loco citato*.

4. ... Sur 1,328 cas de dysenterie reçus en 10 mois à l'Hôpital de Réserve n° 1, 561 appartenaient à la forme amibienne et 766 à la forme bacillaire, que les auteurs désignent aussi sous le nom de dysenterie aiguë ou subaiguë spécifique.

Shiga et Kruse; il ne se rencontre que chez les dysentériques et jamais chez d'autres sujets. Strong et Musgrave n'aboutissent pas à reproduire la maladie chez les animaux par l'ingestion ou l'inoculation rectale des cultures pures. Il en fut autrement chez l'homme. Ces médecins font absorber à un Indien condamné à mort, d'abord du bicarbonate de soude, puis une culture en bouillon âgée de 2 jours. Trente-six heures après apparaissent des selles diarrhéiques, muqueuses, striées de sang qui deviennent de plus en plus fréquentes (31 en 24 heures) et uniquement constituées par des masses de mucus sanglant; la culture y décèle facilement le bacille ingéré. En même temps survenait une fièvre modérée et une sensibilité assez vive de l'abdomen. Le sujet se rétablit rapidement avant son exécution; il ne semble pas que l'autopsie en ait été faite. Cette dysenterie expérimentale de l'homme serait un argument décisif en faveur de la spécificité du bacille ingéré, si elle n'avait été obtenue dans un milieu et à un moment où régnait la dysenterie épidémique; elle n'en a pas moins une grande valeur.

Drigalski[1] rencontre le bacille de Shiga, Kruse et Flexner dans l'épidémie de dysenterie survenue en 1901 parmi les troupes de la garde prussienne campées à Doberitz, et dans une manifestation moins importante qui atteignait à la même époque le 7e corps d'armée. Ce bacille est constant, en quantité prédominante, dans les selles des cas récents, et ne se trouve jamais chez les sujets sains; il est agglutiné exclusivement par le sang des malades. Bien que les résultats expérimentaux sur l'animal ne soient point décisifs, l'auteur admet cependant comme fondée l'opinion de Shiga sur l'action spécifique de ce bacille.

Pfuhl[2] isole un microbe identique dans la petite épidémie de Alexandrowo et chez des soldats du corps expéditionnaire de Chine qui, déjà atteints de dysenterie en extrême Orient, avaient présenté une récidive après le rapatriement; il étudie minutieusement l'action agglutinante du sérum des malades et en fixe la valeur diagnostique. C'est encore le même bacille que Muller[3] rencontre dans l'épidémie de Südsteiermark.

1. Drigalski, *Veroffentlichungen aus dem Gebiete des Militar Sanitäts Wesens*, 1902.

2. Pfuhl, *Idem*.

3. Muller, Ueber den Bakteriologischen Befund bei einer Dysenterie epidemie in Südsteiermark, *Centr. f. Bakt.*, 1902.

Weder et Duval[1] recueillent dans plusieurs épidémies du nord-ouest des États-Unis des bacilles analogues à ceux que Flexner avait isolés à Manille ou à Porto-Rico, réagissant exactement comme ceux de Shiga, Strong et Flexner à l'égard du sérum des malades ou d'un animal immunisé.

A Moscou (1902) Rosenthal[2] étudie 85 cas de dysenterie et trouve toujours dans les selles un bacille identique à celui de Shiga et Kruse, exclusivement agglutiné par le sérum des dysentériques.

Enfin, dans un récent mémoire sur « l'abcès du foie tropical ou amœbien, et ses rapports avec la dysenterie à amibes », Léonard Rogers[3] signale incidemment qu'il a isolé le bacille de Shiga en quelques cas de dysenterie catarrhale, et que les cultures de ce bacille étaient agglutinées par le sérum des malades; cette dysenterie *bacillaire* (catarrhale ou membraneuse) serait même, d'après l'auteur, la forme ordinaire de l'Inde.

De la mention succincte de toutes ces recherches, il ressort donc que dans les régions les plus différentes du globe, tropicales ou tempérées, règne communément une dysenterie caractérisée par un bacille spécial, à peu près identique en tout lieu; sa constance dans les déjections et son agglutination exclusive par le sérum des malades le font considérer comme la cause probable de cette dysenterie.

Les auteurs qui ont étudié la maladie en France depuis la communication de Chantemesse et Widal ne font aucune mention d'un semblable organisme. Les uns (Arnaud, Courtet et Loir, Comte), attribuent au coli-bacille le pouvoir de produire les symptômes et les lésions de la dysenterie. D'autres (Bertrand et Baucher, Laveran) imputent la dysenterie saisonnière des pays tempérés aux microbes commensaux de l'intestin devenus pathogènes sous l'influence d'une exaltation de virulence ou d'une altération préalable de la muqueuse qui les supporte. H. Roger[4] décrit dans la dysenterie parisienne une bactérie très mobile, liquéfiant la gélatine et coagulant le lait, qu'il

1. Weder et Duval, The etiology of acute dysent. in the United-Stats, *Cent. f. Bakt.*, 1902.
2. Rosenthal, Zur Aetiologie der Dysent., *Deutsch. med. Woch.*, 1903.
3. Leonard Rogers, *Journal of tropic. medic.*, février 1903.
4. H. Roger, Recherches sur l'entérite dysentériforme, *Presse médicale* 1900; Le Coli-bacille de la dysenterie, *Presse médicale* 1900.

obtient chez le lapin après injection intra-veineuse de la culture totale des selles dysentériques. Par le même procédé de recherches, il extrait de selles dysentériques envoyées de Bretagne un coli-bacille semblable à celui que Lemoine[1] avait déjà signalé en 1899 dans la dysenterie épidémique de Paris. Pour Moreul et Rieux[2] la dysenterie épidémique du Finistère et d'autres lieux serait due à un bacille très mobile, coagulant le lait, faisant fermenter les sucres, ne produisant que peu ou point d'indol, identique au précédent. Enfin, Lesage[3] a découvert dans la dysenterie coloniale observée à Toulon un micrococque ou streptocoque, le plus souvent en diplocoque à grains égaux ou inégaux, et, dans ce dernier cas, prenant l'aspect d'un ballon muni de sa nacelle. Mais, de ces différents microbes, aucun n'a fait encore la preuve de sa spécificité.

De cette diversité des résultats obtenus en France, faudrait-il donc conclure que la dysenterie épidémique de notre pays n'est pas de même essence que celle des autres régions? Il n'en est rien, comme le démontrent nos recherches bactériologiques et expérimentales à l'occasion de l'épidémie qui a sévi sur une partie de la garnison de Vincennes au cours de l'été 1902.

III

LE BACILLE DYSENTÉRIQUE DE L'ÉPIDÉMIE DE VINCENNES

L'épidémie de Vincennes a donné lieu à 130 atteintes échelonnées du 16 juillet au 24 septembre, et à deux décès. Les recherches bactériologiques n'ont pu porter sur tous les malades, mais pour *tous* les cas typiques et d'invasion récente où l'examen des selles muco-sanglantes a été pratiqué dans de bonnes conditions, les cultures sur plaques de gélose ont permis d'isoler un bacille identique à celui que Shiga, Kruse, Flexner, Strong, Drigalski, Rosenthal, etc., ont rencontré et décrit.

Ce bacille est extrêmement abondant, mais non à l'état de pureté, dans les glaires sanguinolentes; il y est toujours mélangé à diverses bactéries parmi lesquelles domine le coli-bacille. Plus l'affection est récente et de caractère accusé, plus aussi est

1. Lemoine, *Société de biologie*, 1899.
2. Moreul et Rieux, Unité pathogénique de la dysenterie, *Revue de Méd.*, 1902.
3. Lesage, *Presse médicale*, 1901.

grande la proportion de ce bacille spécial; au fur et à mesure que les symptômes intestinaux s'amendent, que les selles perdent l'état glaireux pour devenir fécaloïdes (c'est l'indice habituel de la guérison prochaine), il devient rare, difficile à déceler et ne tarde pas à disparaître. Il persiste pendant toute la durée de la maladie et n'a pas été rencontré après la guérison. Les selles très récemment émises conviennent le mieux à la recherche; après quelques heures il s'est produit une végétation intensive du coli-bacille qui met souvent obstacle à un examen facile et fructueux.

Isolement. — L'examen microscopique des selles est peu applicable à la recherche du bacille dysentérique; ses caractères morphologiques ne permettent pas en effet de le différencier avec une certitude suffisante. Mais il est facile de l'isoler au moyen des cultures sur plaque de gélose. Au début, nous avons utilisé la gélose phéniquée, additionnée de lactose et de tournesol; la gélose ordinaire donnant des résultats sensiblement identiques a été seule employée par la suite.

Un flocon glaireux ou muco-sanglant est lavé à l'eau stérile, puis agité ou dilacéré dans une petite quantité de bouillon. L'ensemencement est fait soit en incorporant une ou deux gouttes de ce liquide à de la gélose ramollie, puis coulée en boîte de Petri, soit en promenant à la surface de la gélose déjà figée une tige de verre ou un pinceau trempés dans la semence. Les plaques sont placées à l'étuve à 37°. L'isolement repose sur cette particularité que les colonies du bacille dysentérique sont toujours plus lentes à se développer, plus claires et moins luxuriantes que celles du coli-bacille auxquelles elles se mélangent. Aussi importe-t-il d'examiner les plaques dans les 24 heures qui suivent l'ensemencement. On marque alors au crayon gras les colonies superficielles qui ont déjà apparu; presque toutes appartiennent au coli-bacille. Les plaques sont remises à l'étuve et examinées après un délai de 12 à 24 heures. Beaucoup de colonies nouvelles ont apparu; le coli-bacille peut bien en constituer quelques-unes, mais la plupart sont généralement formées par le bacille cherché. L'attention doit donc aller aux colonies tardives, petites, pelliculaires, translucides et à reflets irisés; sous le microscope elles sont finement granuleuses, à contours réguliers, un peu foncées au centre, claires et transparentes sur

les bords : c'est ainsi en effet qu'apparaissent à leur début les colonies dysentériques. Après 24 ou 36 heures, elles commencent à s'étaler, s'épaississent, s'opacifient légèrement et deviennent blanchâtres sans tout perdre de leur transparence initiale. Leurs contours restent encore arrondis à l'œil nu, mais au microscope ils sont déchiquetés, le centre est sombre, très granuleux, d'une coloration brun jaunâtre qui se dégrade progressivement pour s'éteindre dans une zone périphérique claire et transparente. Ultérieurement, la colonie prend un aspect blanc crémeux et une forme qui cessent d'être un guide de quelque valeur. Certaines colonies de coli-bacille ressemblent tellement à celles du bacille dysentérique, et inversement, que la diagnose ne doit pas être basée sur ces seuls éléments; néanmoins, c'est parmi les colonies désignées ci-dessus qu'il convient de prélever pour les repiquages en divers milieux.

Morphologie. — Cultures.

Le bacille dysentérique est un bâtonnet mince, court, de 1 à 3 μ, un peu plus épais que le bacille typhique, arrondi à ses extrémités, immobile, dépourvu de cils [1], ne formant jamais de spores, facilement colorable par les solutions d'aniline, mais ne se teignant pas par la méthode de Gram; les formes d'involution sont communes et parfois les cellules bactériennes ne retiennent

1. Les bacilles dysentériques suspendus dans un liquide sont animés d'assez vives oscillations qui peuvent en imposer pour des mouvements propres. Shiga leur a primitivement attribué une légère mobilité et a cru constater une fois l'existence d'un cil. Flexner présente son bacille comme doué de mouvements et quelquefois de cils. Weder et Duval décrivent au microbe qu'ils ont isolé une capsule inconstante et des cils nombreux mesurant 8 à 10 fois la longueur du bâtonnet; d'après ces auteurs, le même appareil cilié appartiendrait aux bacilles de Shiga, Flexner, Strong, Kruse, bien que tous soient immobiles. Schumann (cité par Shiga) aurait trouvé des cils chez plusieurs espèces, y compris celle de Kruse. Mais les affirmations contraires ne manquent pas. Shiga vient de reconnaître la possibilité d'une erreur d'observation au sujet des cils. La commission réunie par Koch pour étudier l'épidémie de Döberitz n'a pu confirmer l'existence des cils chez les différents bacilles examinés, et attribue leur constatation à une faute de technique. Strong décrit le bacille de Manille comme dépourvu de cils. Lentz (*Dysenterie, in Traité de Kolle et Wassermann*) affirme que par une bonne technique il est impossible de reconnaître des cils au bacille dysentérique. MM. Borrel et Nicole ont bien voulu examiner à ce point de vue différents types isolés soit par nous à Vincennes, soit par Shiga, Kruse, Pfuhl, Flexner, Chantemesse, Weder et Duval, et ne sont jamais parvenus à constater l'existence de cils. Il est probable qu'une faute de technique ou une erreur d'observation a dû conduire à l'opinion contraire.

la coloration qu'au niveau des pôles. Il se développe sur tous les milieux usités, surtout à la température de 37°, et mieux au contact de l'air que dans le vide.

Bouillon. — En bouillon peptone il détermine un trouble rapide, uniforme, sans voile à la surface, et donnant par l'agitation des ondes moirées. Vers le 2e jour, un dépôt glutineux commence à se former, s'accentuant par la suite à mesure que les couches supérieures du liquide s'éclaircissent. Le milieu présente une très légère acidité. Dans le filtrat des cultures en bouillon Martin, M. Blanc[1] a constaté l'existence d'acides acétique, succinique, et d'une faible proportion de bases volatiles décelables par la réaction des carbylamines. L'évaporation à basse température laisse un résidu liquide d'une odeur puissante rappelant celle du bacille pyocyanique, et vaguement celle de l'aubépine. Les cultures en masse, surtout sur gélose, donnent plutôt une odeur fade, spermatique. Il n'y a formation d'indol et de scatol ni dans le bouillon ni dans l'eau peptonée.

Le bacille ne fait pas fermenter les sucres et ne donne jamais lieu à développement de gaz dans le bouillon lactosé ou glucosé et carbonaté.

Gélatine. — Il ne liquéfie pas la gélatine et forme, en surface inclinée, une membrane mince, pelliculaire, opaline, débordant un peu la strie d'inoculation, presque identique à celle du bac. typhique. Les colonies séparées prennent en ce milieu un aspect fort analogue à celles de ce dernier; elles sont minces, translucides, à bords découpés, traversées par des sillons semblables aux nervures des feuilles de vigne.

Gélose. — Sur gélose inclinée la culture est mince, humide, glutineuse, d'un blanc opalin, translucide, à peine saillante, à bords légèrement découpés. L'ensemencement par piqûre profonde en gélose sucrée ne donne pas lieu à la production de bulles de gaz. Les colonies développées en gélose lactosée et tournesolée ne modifient pas la teinte bleue du milieu, tandis que le coli-bacille en détermine rapidement le virage au rouge; aussi Drigalski recommande-t-il ce moyen pour l'isolement facile du bac. dysentérique. La gélose au rouge neutre ne présente habituellement aucune décoloration appréciable; celle qui se produit parfois est légère, partielle, exactement semblable à celle que l'on peut

1. Recherche faite à l'Institut de chimie biologique de l'Institut Pasteur.

observer avec le bacille typhique. Dans les mêmes conditions le coli-bacille détermine au contraire une décoloration rapide et complète[1].

Pomme de terre. — La culture sur pomme de terre présente à son début l'aspect d'une glaçure humide, brillante, très mince, peu visible, identique à celle du bac. typhique; elle s'épaissit un peu et blanchit par la suite. Quelques échantillons donnent une culture qui, tout en conservant le caractère de glaçure humide, se colore légèrement en blanc grisâtre ou jaunâtre.

Lait. — Le développement dans le lait stérilisé produit une très faible acidité, mais jamais de coagulation; quelquefois cependant, vers le dixième jour, le liquide semble moins fluide et prend une légère consistance qui disparaît par une simple agitation. La teinte du lait tournesolé n'est pas modifiée, ou bien il se produit un faible virage n'excédant pas celui que le bac. typhique détermine dans les mêmes conditions.

La culture sur sérum coagulé est blanc jaunâtre, sans caractère spécial.

En résumé, le bac. dysentérique ne produit jamais d'indol, reste sans action sur les sucres et ne coagule pas le lait, ce qui le sépare nettement du coli-bacille; par ces caractères et les modes de culture il se rapproche du bac. typhique, dont le distingue aisément l'absence de cils et de motilité.

Vitalité du bacille. — La vitalité des cultures n'est guère prolongée; après un mois et demi à deux mois, il est difficile et le plus souvent impossible de les revivifier. Ne formant pas de spores, le bac. dysentérique (du moins celui que l'on entretient dans les laboratoires) résiste peu aux causes de destruction. Un chauffage à 58° pendant une heure suffit à le tuer; il survit à peine 20 à 25 jours à la dessiccation; l'alcool, l'éther, le chloroforme agissant en tubes scellés le détruisent en quelques heures, surtout à la température de 37°[2]. Il est vraisemblable que le

1. Dans l'ens mencement profond en gélose mannite-tournesol, le bac. dysentérique réduit la couleur des couches i. férieures sans changer celle des couches supérieures. En signalant cette particularité, O. Lentz la considère comme caractéristique et suffisante pour distinguer le bac. dysentérique des bacilles typhique et coli, qui développent de l'acidité en ce milieu et le rougissent après 24 ou 48 heures. (O. Lentz. Art. Dysenterie, *Traité de bact. de* Kolle *et* Wassermann.)

2. D'après O. Lentz :

L'eau phéniquée	à 0, 50 0/0	le	détruirait	en 6 heures;
—	à 1 00	—	—	en 30 minutes;
—	à 5 0/0	—	—	en quelques instants;
Le sublimé	à 1/20,000	—	—	en quelques instants.

bac. dysentérique doit rencontrer dans la nature des conditions particulières de résistance, car dans les régions tempérées où la maladie est endémique, comme en Bretagne, on la voit se reproduire annuellement au cours de l'été, après une intermission complète pendant les saisons intermédiaires[1].

Les attributs ci-dessus appartiennent invariablement à tous les échantillons de bacilles isolés pendant l'épidémie de Vincennes; à part quelques variantes sans importance, ils se sont montrés superposables à ceux que présentaient dans des cultures parallèles les bacilles recueillis en différents pays par Shiga, Kruse, Flexner, Pfuhl et Chantemesse. L'identité se complète par l'épreuve de l'agglutination.

Agglutination du bacille dysentérique.

L'existence d'une agglutinine spécifique dans le sang des sujets atteints ou convalescents de dysenterie est bien établie depuis le travail de Shiga; elle constitue un argument important en faveur de la spécificité du bacille isolé. Les observations que nous avons pu faire à son sujet en confirment toute la valeur.

A. — La culture de chacun des bacilles recueillis pendant l'épidémie de Vincennes a été agglutinée non seulement par le sérum du malade qui avait fourni le bacille, mais encore par le sérum des autres sujets atteints au cours de l'épidémie, et aussi celui de dysentériques observés au même moment en d'autres régions de France[2]. Les mêmes cultures n'ont jamais été actionnées par le sérum de sujets sains, de sujets atteints de fièvre typhoïde ou d'affections diverses. Si l'on accorde à la propriété agglutinante d'un sérum le caractère de spécificité absolue qui ressort de tous les faits connus, il découlera de cette constatation : 1° que les épidémies observées sur plusieurs points de France pendant l'été 1902 étaient de nature identique et dues à l'intervention du même microbe; 2° que la séro-réaction peut être rationnel-

1. Selon O. Lentz, les bacilles peuvent conserver leur vitalité pendant plusieurs mois s'ils sont à l'abri de la lumière directe, de la dessiccation, de la destruction par d'autres bactéries, comme par exemple, dans la terre humide de jardin ou dans de la toile de lin humide, desséchée seulement à la surface.

2. Un sérum n'était déclaré agglutinant que s'il agissait à la dilution minimale de 1/20e; au-dessous de ce titre, pour éviter toute cause d'erreur, la réaction n'était pas considérée comme décisive.

lement appliquée à la diagnose de la dysenterie saisonnière.

B. — La propriété agglutinante du sérum se montre constante dans les atteintes graves, sévères ou moyennes, d'autant plus accusée que la maladie est plus intense, mais peut faire défaut dans les formes légères ou fugaces, marquées par une simple diarrhée un peu glaireuse. Elle apparaît en général à la fin du premier septénaire, du 7e au 12e jour, persiste pendant toute la maladie et survit un certain temps à la guérison. Les circonstances de l'observation ne nous ont pas permis d'établir la limite ordinaire de sa durée. Parfois l'agglutinine disparaît rapidement; le plus habituellement elle se retrouve, même à un taux élevé, durant 15 à 25 jours après la guérison. Le sérum d'un sujet guéri depuis trois mois d'une atteinte grave n'était plus agglutinant[1]. Une séro-réaction positive permet donc le diagnostic rétrospectif d'une affection récemment guérie et dont il importe de fixer la nature.

C. — Le pouvoir agglutinant des sérums examinés a varié depuis 1/20e jusqu'à 1/300e Un sérum agglutinant exerçait la même action sur *tous* les bacilles recueillis pendant l'épidémie de Vincennes, ou isolés ailleurs par Shiga, Kruse, Flexner, Pfuhl, Chantemesse. Mais la proposition n'est vraie, au sens absolu, que pour les sérums forts et moyennement actifs, lesquels agglutinent invariablement tous les spécimens du bacille dysentérique; ceux dont le pouvoir est au minimum, égal ou à peine supérieur à 1/20e (cas bénins), sont parfois inactifs sur certaines cultures. En outre, un sérum fort peut n'être pas actif aux mêmes doses sur des bacilles de provenance différente : il les agglutine à des titres inégaux, depuis 1/300 jusqu'à 1/80; le fait n'a rien de spécial au bacille dysentérique.

Le sérum d'une chèvre immunisée par les cultures d'*un* bacille dysentérique agglutinait sans exception *tous* les autres échantillons, nostras ou étrangers. Cette agglutination constante de tous les bacilles examinés par le sérum de l'homme malade ou d'un animal immunisé doit être retenue comme une nouvelle preuve de l'identité des bacilles recueillis dans les

1. D'après Strong et Musgrave, l'agglutinine peut apparaître dès le 3e jour, elle est spécialament active vers le 5e et le 6e jour, persiste parfois pendant des mois, mais disparaît généralement plus tôt; dans un cas elle a persisté pendant six mois.

diverses manifestations de la dysenterie épidémique en Europe, au Japon, aux États-Unis, aux Philippines[1].

D. — Le sérum des dysentériques n'agglutine jamais le bacille typhique. Il demeure inactif sur de nombreux spécimens de bactérium coli, mais non sur tous : assez fréquemment on le voit actionner, même à des titres élevés (1/600, 1/800), certaines variétés de coli-bacille ; d'après Strong et Musgrave l'agglutination atteindrait principalement les espèces douées d'un faible pouvoir fermentatif sur les sucres. Le fait n'a rien d'insolite et ne prête à aucune ambiguité. Il est, en effet, notoire que le coli-bacille peut être agglutiné par n'importe quel sérum humain, et celui des dysentériques ne fait pas exception. On conçoit d'autre part qu'une affection ulcérative du gros intestin ouvre facilement la porte à une infection coli-bacillaire venant s'ajouter à la première en cause.

E. — La culture des bacilles dysentériques de Vincennes, comme celle des bacilles de Shiga, Kruse, Flexner et Pfuhl, n'a pas été agglutinée par le sérum de malades atteints de diarrhée de Cochinchine et de 14 sujets affectés d'une dysenterie chronique contractée en Extrême-Orient. Ce résultat, rapproché des précédents, fournit un appui à la conception actuelle qui attribue une nature et une origine distinctes à la dysenterie dite tropicale. Cependant, dans un cas de cette espèce, le sérum du malade a agglutiné au 1/20e trois échantillons de bac. dysentérique sur 11 examinés. Pareille constatation a été déjà faite à Manille par Strong et Musgrave qui, dans trois cas de dysenterie amibienne, ont trouvé un sérum agglutinant le bac. dysentérique; ils supposent, et l'hypothèse est au moins vraisemblable, que cette circonstance doit traduire une double infection par l'amibe et le bac. dysentérique. On admettra sans peine que, dans les lieux et les temps où les deux formes de la maladie règnent de concert, il puisse se produire des contagions réciproques.

1. Le sérum anti-dysenterique de Moreul et Rieux qui nous a été remis par M. Chantemesse n'a jamais agglutiné nos bacilles dysentériques.

Le bacille donné par ces auteurs comme la cause de la dysenterie bretonne est très fréquemment, mais non toujours, agglutiné par le sérum de dysentériques (15 fois sur 20). Mais il est aussi actionné par le sérum des dysenteries tropicales (10 fois sur 17), des typhoïdiques (2 fois sur 3), ou de malades atteints d'affections les plus diverses (10 fois sur 17 cas). A ce point de vue il se comporte exactement comme le coli-bacille.

IV

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES

Si la constance d'un même microbe dans les selles dysentériques et le fait de son agglutination exclusive par le sérum des malades constituent des arguments de haute valeur pour sa spécificité pathogène, la preuve décisive n'en peut être fournie que par la réalisation expérimentale de l'affection au moyen des cultures pures.

L'épreuve a été faite sur l'homme par Strong et Musgrave, mais sa signification, pour si grande qu'elle soit, n'en est pas moins passible de certaines objections[1].

L'expérimentation sur les animaux de laboratoire n'a donné entre les mains de Shiga, Strong, Drigalski, Conradi, Rosenthal, etc., que des résultats d'un intérêt relatif; ils établissent que de nombreuses espèces animales sont sensibles à l'action du bac. dysentérique, mais non qu'une maladie semblable à celle de l'homme soit réalisable. L'infection par la voie rectale ou gastrique a déterminé passagèrement chez le chien, le chat, le singe, des selles diarrhéiques, parfois muqueuses, une seule fois striées de sang (singe), et, à l'autopsie, de l'hyperémie et quelques points hémorragiques dans les régions supérieures de l'intestin grêle. L'infection par les voies sanguine, intrapéritonéale ou sous-cutanée a été suivie de la mort des cobayes, lapins, chiens et chats, avec de la diarrhée et de la paralysie des pattes postérieures ; à l'autopsie, on rencontrait du liquide dans l'intestin grêle, du mucus sanglant dans le colon et un œdème hyperémique de la muqueuse. Mais la dysenterie humaine se traduit par d'autres symptômes et d'autres lésions qui n'ont pas été reproduits ; et c'est précisément l'indécision de ces résultats expérimentaux qui a laissé quelques doutes sur la spécificité du bacille décrit.

Nos recherches établissent que l'on peut, à l'aide des cultures pures, provoquer chez diverses espèces animales les symptômes et les lésions caractéristiques de la dysenterie épidémique de l'homme.

Nombreuses sont les espèces animales sensibles à l'action

1. Il faut encore citer les trois cas d'inoculation accidentelle par les cultures observées l'un par Flexner et les deux autres par Kruse ; ce sont évidemment des faits dont on doit tenir compte.

du bac. dysenterique. Le cheval réagit vivement à l'inoculation sous-cutanée et peut être tué par une faible dose. La chèvre, beaucoup plus résistante, succombe à des injections répétées. Mais ces animaux constituent un matériel bien coûteux pour se prêter aux recherches. La souris, le rat, le cobaye périssent trop rapidement après l'infection péritonéale pour faciliter l'expérimentation; ils meurent alors avec une péritonite exsudative et des lésions de l'intestin grêle semblables à celles que provoque le bact. coli ou le bacille typhique. Le porcelet et le chien, en raison de leur résistance relative, et aussi le lapin malgré sa sensibilité plus marquée, représentent les animaux de choix; c'est sur eux que l'on obtient des lésions typiques.

Les modes d'infection ont été très variés.

L'ingestion prolongée et copieuse n'a rien donné chez le chien et le chat, même en la faisant précéder d'une irritation du tube digestif au moyen de l'huile de croton. L'introduction directe de grandes quantités de cultures dans l'intestin grêle du chien (après laparotomie) n'a produit aucun effet appréciable.

L'inoculation intra-veineuse tue les animaux (lapin, chien, porcelet) en quelques heures, sans permettre aux lésions de s'établir.

L'injection de faibles doses dans le foie, la vésicule biliaire ou l'appendice vermiforme du lapin tue cet animal en 5, 6 ou 7 jours, avec de la paralysie du train postérieur et un œdème souvent hyperémique de la muqueuse du gros intestin.

L'infection par la voie sous-cutanée nous a paru préférable, elle est aussi plus facile et donne des résultats suffisamment caractéristiques; c'est donc à elle que nous avons eu surtout recours.

Lapin. — L'inoculation sous cutanée détermine une élévation thermique (39°5 - 40°) avec abattement marqué, de la diarrhée muqueuse, une paralysie du train postérieur, quelquefois des quatre membres; puis l'hypothermie s'établit et progresse jusqu'à la mort, qui survient du 4e au 6e jour. Un liquide diarrhéique remplit l'intestin grêle; le colon est tapissé de glaires souvent sanglantes. Presque tout l'intestin paraît altéré, parfois même l'estomac, mais les lésions principales siègent dans le colon au voisinage du cæcum. Elles consistent soit en un œdème pâle, gélatineux, avec épaississement considérable

de la muqueuse, soit, le plus souvent, en une tuméfaction œdémateuse avec hypérémie très vive et suffusions hémorragiques, localisées ou diffuses, donnant à la muqueuse l'aspect d'un velours rouge sombre. Sur les replis de la membrane se détachent parfois (pl. 10 et 11, fig. 1) des petits foyers de nécrose superficielle sous la forme de taches lenticulaires, grisâtres ou jaunâtres, et des ulcérations punctiformes à fond hémorragique. Le contenu de ce segment est constitué par des glaires épaisses, sanglantes, identiques aux selles dysentériques de l'homme et contenant le bacille dysentérique. Les prises faites dans l'épaisseur de la muqueuse donnent le même bacille à l'état de pureté. Ce sont bien là dans leur essence les lésions typiques de la dysenterie humaine, et la superpositon devient encore plus parfaite à l'examen histologique.

Chien. — L'inoculation intra-veineuse peut le tuer en quelques heures sans autre lésion qu'une légère hypérémie de l'intestin. Par l'inoculation sous-cutanée, surtout chez le chien jeune ou débilité par un artifice, on obtient l'image vraie de la dysenterie avec ses besoins douloureux et fréquents, ses selles caractéristiques et ses lésions spéciales. La dose inoculée doit être assez copieuse : la culture de 1 ou 2 tubes de gélose suivant la virulence du bacille. Presque aussitôt après l'inoculation la température s'élève de 1°-1°5. Au point infecté se forme un œdème dur, étalé, contenant un liquide hématique sans globules rouges visibles, et riche en bacilles. Puis l'animal perd l'appétit, devient triste, reste couché dans sa cage qu'il refuse de quitter, et paraît souffrir ; parfois il gémit et semble torturé par des besoins répétés. Les selles sont tantôt dures, d'apparence fécale, noires, constituées par des matières ovillées que coiffe un mucus concret et strié de sang ; tantôt molles, mais visqueuses et cohérentes, semblables aux crachats rouillés de la pneumonie ; tantôt plus fluides et s'étalant en nappes de mucus mélangé de sang : alors on voit l'animal rejeter au cours de la journée des placards glaireux et sanglants, identiques à ceux de la dysenterie grave de l'homme, et dans lesquels la culture décèle l'existence presque pure du bacille spécifique. L'amaigrissement est rapide. Après une courte période de fièvre modérée, l'hypothermie s'établit, et l'animal meurt du 3e au 6e jour avec une température de 34°, 32°.

Les lésions macroscopiques sont celles de la dysenterie humaine, et, comme dans cette dernière, se cantonnent sur la portion inférieure du gros intestin, le rectum en particulier. Ces segments sont épaissis, recouverts d'un mucus visqueux et sanglant. La muqueuse en est tuméfiée, œdémateuse, très hyperémique, comparable encore à un velours rouge sombre, marbré de suffusions hémorragiques. On y trouve, clairsemés ou confluents, des foyers de nécrose superficielle sous la forme de taches jaunâtres ou grisâtres, d'aspect sec et écailleux, et quelquefois aussi de petites ulcérations peu profondes, à bords irréguliers et taillés à pic, résultant de l'élimination des points sphacélés. (Pl. X, fig. 3.) Ce sont bien là encore les lésions de la dysenterie épidémique.

L'intestin grêle n'est pas exempt d'altérations : hypérémie légère, tuméfaction de la muqueuse, ecchymoses discrètes, quelquefois de véritables exulcérations dans la portion terminale. On peut aussi rencontrer dans l'estomac la même hyperémie avec suffusions sanguines et petits îlots de sphacèle.

Les ganglions mésentériques sont augmentés de volume et hémorragiés. Les autres viscères ne présentent pas de lésions appréciables à l'œil nu.

Les prises faites dans les régions altérées de la muqueuse donnent des cultures pures du bac. dysentérique.

Porcelet. — Le porcelet, sur lequel nous avons pu expérimenter, grâce à l'obligeance de M. Nocard, est aussi sensible que le chien à l'action du bac. dysentérique. L'infection intraveineuse le tue en quelques heures sans autres désordres appréciables qu'une rougeur framboisée de tout le tégument externe et la congestion viscérale.

Après l'inoculation sous-cutanée, la température s'élève de 1°, et il se forme au point infecté une tuméfaction œdémateuse avec teinte ecchymotique de la peau qui la recouvre. Puis la fièvre tombe, l'animal perd l'appétit, apparaît manifestement souffrant, reste blotti dans son box, maigrit; il rejette des excréments secs, coiffés d'un mucus concret. Une paralysie rapidement progressive envahit le train postérieur, puis les quatre membres. Bientôt l'hypothermie s'établit, abaissant la température jusqu'à 34°. Un des porcelets ainsi inoculés s'est rétabli après une longue période de maladie. L'autre a succombé

le onzième jour avec des lésions sur tout le tractus intestinal. L'iléon était épaissi, œdémateux, très hyperémié, tapissé de glaires visqueuses. Mais c'est dans le gros intestin, et particulièrement au niveau du cæcum, que siégeaient les altérations les plus accusées : l'organe était quadruplé d'épaisseur, infiltré, extrêmement hyperémié; sur la teinte rouge sombre de la muqueuse se détachaient des taches jaunes ou grisâtres de nécrose superficielle. Le foie, congestionné et parsemé de plaques ocreuses, présentait les caractères du foie infectieux. Les reins étaient atteints de néphrite diffuse; l'urine prise dans la vessie donnait une forte proportion d'albumine. Enfin il existait une péricardite totale avec symphyse récente et foyers sous-jacents de myocardite. Rate normale.

Si, dans ce cas, la nature des selles n'a pas été exactement celle de la dysenterie humaine, du moins les lésions intestinales et viscérales en ont-elles fourni la reproduction exacte.

Chez les trois espèces animales, les résultats expérimentaux sont donc conformes. Après une culture préalable au point inoculé, le microbe que conduit une affinité vraiment élective envahit la muqueuse intestinale, surtout celle du colon, et s'y localise en déterminant des altérations toujours semblables. C'est un fait remarquable de voir une bactérie pathogène introduite sous la peau se diriger aussi invariablement vers un viscère unique, l'intestin, se cantonner pour ainsi dire dans une de ses tuniques, la muqueuse, et, sans toucher le plus souvent les autres organes, appesantir en ce point tous ses effets.

Lésions histologiques de la dysenterie expérimentale.

La similitude des altérations macroscopiques avec celles de la dysenterie épidémique se poursuit à l'examen histologique.

Chez l'homme, les lésions intéressent essentiellement la muqueuse proprement dite et la partie contiguë de la celluleuse. Elles se résument dans le processus suivant : desquamation du revêtement épithélial, hypersécrétion des glandes tubulaires; — épaississement du tissu adénoïde par infiltration de plasma, de leucocytes et de globules rouges; — hypérémie considérable des vaisseaux, altération de leur paroi, extravasations sanguines dans le tissu inter et sous-glandulaire de la muqueuse et la portion supérieure de la celluleuse; — élargissement et encombre-

ment des fentes lymphatiques par des cellules d'apparence épithélioïde, œdème de la celluleuse; — îlots de nécrose qui d'abord pelliculaires et superficiels, gagnent en profondeur et peuvent atteindre jusqu'à la base des glandes; ulcères à bords réguliers résultant de l'élimination des parties nécrosées.

Toutes ces altérations se retrouvent dans la dysenterie expérimentale du lapin, du chien, du porc avec une netteté et une précision qui ne laissent aucun doute sur l'identité du processus dans les deux cas (Pl. XI, fig. 1 et 2. Pl. XII, fig. 2. Pl. XIII, fig. 1). Ici comme là, ce sont les mêmes lésions de catarrhe, la même hypérémie excessive avec infiltration œdémateuse et leucocytaire de la muqueuse, l'énorme tuméfaction du tissu adénoïde, les altérations constantes des vaisseaux dont les parois vitreuses et uniformément colorées traduisent la nécrose de coagulation, qui les frappe à un degré peu habituel dans la dysenterie de l'homme. Des extravasations sanguines diffusent dans toutes les parties de la muqueuse, en disloquent les éléments et les bouleversent au point de les rendre méconnaissables. Les lymphatiques sont élargis et distendus par un liquide riche en cellules volumineuses. Des îlots de nécrose parsèment les replis de la muqueuse. Les uns, superficiels, n'intéressent que l'épithélium de revêtement, sa membrane basale et l'orifice des glandes. D'autres, plus profonds, atteignent à différentes hauteurs les parties sous jacentes, tissu adénoïde et tubes glandulaires; ils peuvent aller jusqu'aux culs-de-sac lieberkuhniens et intéresser même la *muscularis mucosæ* : tous sont bordés par une zone d'infiltration leucocytaire. Enfin, des ulcères véritables font suite à la chute des eschares. Il serait réellement impossible, au point de vue anatomo-pathologique, de différencier la dysenterie humaine de la dysenterie expérimentale (Pl. XI, fig. 1. Pl. XII, fig. 1).

Répartition du bac. dysentérique dans l'intestin et les autres organes.

Ces désordres anatomiques sont commandés par la multiplication du bac. dysentérique dans la muqueuse intestinale; il y est, en effet, abondamment réparti. À la surface, surtout aux points nécrosés, le bacille est mélangé aux multiples espèces de la flore locale et souvent difficile à reconnaître. Mais dans les parties sous-jacentes il se trouve en culture pure, aggloméré en

îlots ou dispersé dans les mailles œdématiées du tissu adénoïde, dans les tubes lieberkuhniens dont la cavité en est parfois encombrée, entre les cellules glandulaires qu'il entoure et disjoint de la paroi (Pl. XIII, fig. 2 et 3). Sa répartition n'est pas uniforme. Si on le rencontre partout dans la muqueuse, il est surtout abondant là où la nécrose est le plus marquée et les lésions vasculaires sont particulièrement accusées, comme s'il y avait une relation directe entre le processus de nécrose et la pullulation du bac. dysentérique; en ces points il forme des amas ou des traînées confluentes qui, sur les coupes colorées à la thionine, tranchent vivement par l'intensité de la teinte. Autour de ces îlots microbiens il existe d'habitude un afflux de leucocytes, dont l'état granuleux et le noyau incolore trahissent la grave altération. En règle presque générale, ces bacilles abondent surtout dans la partie moyenne de la muqueuse ; ils diminuent à mesure qu'on s'approche de la *muscularis mucosæ*, et se montrent rares dans la couche vasculaire et la celluleuse.

Telle est aussi l'exacte répartition du bac. dysentérique dans l'intestin de l'homme d'après la description de Strong et les faits que nous avons eus sous les yeux à propos de l'épidémie de Vincennes. On conçoit dès lors que la nécrose et l'ulcération de la muqueuse déversent incessamment dans les déjections, et au dehors par les selles, l'agent de la contagion.

Le bac. dysentérique se trouve-t-il ailleurs que dans l'épaisseur des tuniques intestinales?

Nos recherches chez l'homme n'ont pu porter que sur le vivant et le sang de la circulation générale : jamais le bac. dysentérique n'y a été rencontré. Shiga l'a trouvé dans les ganglions mésentériques, mais point dans la rate, le foie, l'urine.

Chez les animaux d'expérience qui ont succombé à l'infection *sous-cutanée*, le bacille s'est montré constant au foyer de l'inoculation. Particulièrement chez le chien et le porc, il se produit toujours en ce point une lésion locale très accusée, une tuméfaction œdémateuse remplie d'une sérosité hématique où le bacille fourmille ; lorsque la survie a été un peu longue, cette lésion aboutit à la formation d'une poche à parois lardacées et jaunâtres, renfermant une substance caséiforme dans laquelle le bacille se rencontre encore. Dans les ganglions mésentériques correspondant aux segments les plus altérés de l'intestin, le

bacille a été trouvé, par la culture, environ 1 fois sur 2. Il est exceptionnel de le déceler dans la rate (2 fois sur 23), dans le foie (4 fois sur 25); on ne le rencontre pas dans le sang du cœur.

Ces résultats conformes à ceux de Shiga, Kruse, etc., établissent que le bacille ne se généralise pas; la dysenterie n'est donc pas une maladie septicémique, mais une affection dont le microbe se cantonne à peu près exclusivement dans la muqueuse intestinale et les ganglions lymphatiques correspondants.

Action des cultures tuées.

Les cultures tuées ne sont pas inoffensives. Drigalski et Conradi[1] ont constaté que l'injection intra veineuse ou sous-cutanée de bacilles tués par le chloroforme détermine chez le lapin la diarrhée et la mort, avec des lésions intestinales allant jusqu'à l'ulcération; si l'inoculation est faite sous la peau, il se forme en ce point une infiltration notable et parfois un abcès lorsque la survie a été assez longue.

Les mêmes résultats s'obtiennent avec les cultures tuées par le chauffage à 58°, 67° pendant une heure, et même 85° pendant 30 minutes. Bien que la température de 58° suffise à détruire le bacille dysentérique, les cultures précédentes n'en restent pas moins nocives quand elles sont inoculées aux lapins dans les veines, le péritoine ou sous la peau. Suivant la dose injectée, les animaux peuvent succomber en moins de 24 heures (injection veineuse), en 2, 3 ou 8 jours (injection péritonéale ou sous-cutanée); dans ce dernier cas, ils présentent avant de mourir de la diarrhée glaireuse, une paralysie du train postérieur et de l'hypothermie progressive, exactement comme les animaux infectés avec les cultures vivantes. Après l'inoculation péritonéale, la séreuse est vivement enflammée, remplie d'un liquide visqueux, filant, grumeleux. A l'injection sous-cutanée succède une tuméfaction localisée; le gros intestin renferme un liquide glaireux, abondant; la muqueuse est épaissie, œdémateuse, d'un rouge sombre semé d'extravasats sanguins.

Ces résultats qui reproduisent, au degré près, les suites de l'infection par le bacille vivant, conduisent à penser que la nocuité des cultures mortes doit avoir pour cause une substance

1. DRIGALSKI, *Veröffentlichungen aus dem Gebiete des Militär-Sanitätswesens*, H. XX, 1902.

toxique retenue à l'intérieur des cellules microbiennes et libérée dans l'organisme. Cette toxine peut être mise en évidence.

Toxine dysentérique.

Le bacille dysentérique ne paraît pas sécréter de toxine soluble, du moins n'en existe-t-il pas en quantité appréciable dans les divers milieux liquides où il a cultivé. On peut injecter dans le péritoine des lapins 20, 30 et même 50 c. c. du filtrat sur porcelaine de cultures en bouillon peptone âgées de 5 jours, sans déterminer d'autre effet qu'un amaigrissement passager. Mais le sang de ces animaux acquiert la propriété agglutinante, et cette propriété augmente à mesure que les injections sont renouvelées.

Si on ne connaît pas jusqu'ici la toxine soluble, du moins peut-on, par la macération aqueuse des corps microbiens tués, extraire une substance toxique produisant les mêmes effets que l'inoculation des bacilles eux-mêmes. Ce fait, déjà mentionné par Drigalski et Conradi, permet d'étudier les propriétés essentielles du poison dysentérique. Les cultures sur gélose en large surface (fioles plates) fournissent, après raclage au pinceau, une abondante provision de microbes. Ceux-ci sont tués par le chloroforme ou le chauffage à 58°, puis additionnés d'eau stérile et abandonnés en vase clos, à la température de 37°, pendant 20, 30 ou 40 jours. Par la sédimentation lente, l'épaisse émulsion se clarifie et la décantation donne un liquide limpide, absolument privé de bacilles, et dont la toxicité, variable selon les cultures, est relativement grande. L'injection de 1 c. c., 3/4 de c. c., 1/2 c. c. de ce liquide, dans la veine auriculaire d'un fort lapin, le tue en 18 ou 24 heures. A l'inoculation succède une ascension thermique de 1° à 1°,5, parfois de la diarrhée muqueuse, et la mort survient en hypothermie. La muqueuse ne présente souvent aucune modification appréciable; parfois elle est hyperémiée et œdémateuse.

L'inoculation sous-cutanée à la dose de 1,5 c. c., 2 c. c. donne des résultats plus intéressants. La survie des lapins est toujours plus longue : ils meurent en hypothermie du 5e au 11e jour, après avoir présenté de la diarrhée et de la parésie des membres. Le gros intestin est alors le siège des altérations caractéristiques que provoque l'inoculation des microbes vivants ou morts. Son

contenu est souvent formé de glaires sanglantes; sa muqueuse est œdématiée, d'un rouge vif ou sombre, avec des ecchymoses, des hémorragies diffuses et des points de nécrose superficielle sur le sommet des replis. Parfois les ganglions mésentériques sont gros et rouges, et le foie est parsemé de plaques ocreuses. Les altérations histologiques que présente la muqueuse intestinale sont exactement semblables à celles qui s'observent après l'inoculation des cultures vivantes (pl. X, fig. 4).

Chez le chien, l'inoculation sous-cutanée du maceratum détermine, comme chez le lapin, une ascension thermique de 2° à 2°,5, et une véritable dysenterie clinique avec des selles liquides et muco-sanglantes; mais l'animal ne meurt pas après avoir reçu 5 c. c., 10 c. c. du liquide toxique.

La toxine dysentérique est peu sensible à l'action de la chaleur. Le chauffage en vase clos à 60°, 70°, et même 75° pendant 1 heure ne diminue presque rien de son activité. La température de 75° à 80° appliquée durant le même temps l'affaiblit notablement, mais ne la détruit pas : un liquide dont 1 c. c. injecté dans la veine tue le lapin en quelques heures ne le tue plus, après ce chauffage, qu'en 3, 8 ou 11 jours à la dose de 4 c. c. Si le chauffage a été poussé jusqu'à 81°, la toxine se montre sans action, même à dose élevée.

La toxine extraite des corps microbiens détermine donc les mêmes effets locaux et généraux que le bacille dysentérique vivant. Injectée sous la peau, cette toxine manifeste une affinité élective pour la muqueuse intestinale, surtout celle du gros intestin; elle y localise son action et provoque l'hypersécrétion glandulaire, les lésions vasculaires, l'œdème phlegmasique, la nécrose épithéliale et les points de sphacèle qui caractérisent les lésions dysentériques. En cela le poison se rapproche singulièrement des toxines végétales, l'abrine et la ricine, qui, par une même affinité élective, se fixent sur la muqueuse intestinale pour y provoquer des lésions analogues. Mais le poison dysentérique exerce en outre une action quasi constante sur le système nerveux, laquelle se traduit par la paralysie des membres et l'hypothermie terminales. C'est donc la toxine sécrétée au cours de la multiplication des bacilles spécifiques dans la muqueuse intestinale qui engendre les lésions anatomiques et les symptômes généraux propres à la dysenterie. Celle-ci devient dès

lors une maladie d'intoxication à siège intestinal, comme le choléra.

Tous les résultats expérimentaux relatés ci-dessus, qu'ils soient produits par les microbes vivants, les microbes morts ou la toxine, s'obstiennent indifféremment avec les divers échantillons de bacilles soumis à notre étude, bacilles provenant de Shiga, Kruse, Flexner, Pfuhl, Chantemesse, ou isolés pendant l'épidémie de Vincennes. Cette uniformité de leur action est une nouvelle preuve de l'identité complète des bacilles dysentériques rencontrés dans les différents pays.

Immunisation des animaux.

L'immunisation des petits animaux de laboratoire n'est pas une pratique aisée en raison de leur grande sensibilité à l'action du bacille vivant ou mort et de sa toxine; presque tous finissent par périr, soit d'accidents rapides, soit de cachexie. Leur immunisation n'offrirait d'ailleurs qu'un intérêt théorique.

L'immunisation des grands animaux, comme la chèvre et le cheval, présente plus d'importance parce qu'elle permet de viser l'obtention d'un sérum utilisable pour l'homme; elle n'en a pas moins ses difficultés, car le cheval est également très sensible au bac. dysentérique et la mort rapide peut être la conséquence d'une inoculation discrète. Toutefois cette immunisation est possible; elle est déjà réalisée en plusieurs laboratoires, et il demeure acquis que le sérum des animaux préparés possède des propriétés préventives certaines. Les travaux de Shiga[1] au Japon, de Kruse[2] en Allemagne, de Frédéric Gay[3] aux États-Unis, comme aussi les résultats que nous avons constatés chez l'animal, autorisent à penser que la sérothérapie deviendra sans doute applicable à la prévention et au traitement de la dysenterie épidémique.

CONCLUSIONS

Des développements qui précèdent il est permis de tirer les conclusions suivantes :

1° Dans les selles muco-sanglantes de la dysenterie épidé-

1. SHIGA, *loco cit.* (*Deutsch. med. Woch.*, 1901, XXVII.)
2. KRUSE, Die Blutserumtherapie bei der Dys., *Deuts. med. Woch.*, 1903.
3. F. GAY, *Vaccination et sérothérapie contre le bac. dys.*, *Bulletin medic. of University of Pensylvanie*, 1902.

mique de France on trouve un bacille absolument identique au bacille dit de Shiga. Il est exclusivement agglutiné par le sang des sujets atteints de cette forme de dysenterie; le sang des sujets affectés de la dysenterie dite tropicale ne l'agglutine pas;

2° Par l'inoculation sous-cutanée de ce bacille ou de la toxine qu'il contient, on détermine chez certaines espèces animales les symptômes et surtout les lésions caractéristiques de la dysenterie épidémique;

3° Le bacille découvert et sommairement décrit en 1888 par Chantemesse et Widal, différencié ultérieurement par Shiga, doit être considéré comme la cause spécifique de la dysenterie épidémique des pays tempérés, et d'une dysenterie de même nature existant aussi dans les pays chauds (Porto-Rico, Philippines, Indes anglaises).

Existe-t-il encore d'autres formes de dysenterie bacillaire, et le démembrement de l'ancienne unité doit-il être poursuivi?

Kruse a décrit dans la dysenterie des asiles d'aliénés un bacille exactement semblable au précédent, agglutinable par le sang des malades, mais non par le sérum d'un animal immunisé contre le véritable bacille dysentérique. De ce fait, il conclut à l'existence d'affections évoluant à la manière de la dysenterie vraie et dont la cause serait un bacille « pseudo-dysentérique »; par la suite il aurait isolé dix nouvelles espèces de « pseudo-dysentériques ». Les recherches de Weder et Duval aux États-Unis ne sont pas favorables à cette thèse : dans les épidémies d'hospices, d'institutions, de maisons d'aliénés, ces auteurs ont rencontré un bacille identique à celui des épidémies ordinaires, se comportant à l'égard des sérums spécifiques exactement comme ce dernier et d'autres échantillons types.

Duval et Bassett [1], dans 42 cas de diarrhée infantile, auraient isolé un bacille identique à celui de Shiga, Flexner, Kruse, Strong et semblablement agglutinable par le sérum des malades; pour eux, la diarrhée estivale des enfants serait produite par l'agent pathogène de la dysenterie des adultes. Ce point demande confirmation.

Rien n'établit que les bactéries décrites par H. Roger, Moreul et Rieux dans la dysenterie nostras, par Lesage et Metin dans les

1. The etiology of the Summer diarrheas of infants, *Centr. f. Bakt.*, 1903.

dysenteries coloniales, correspondent à des formes différenciées de la maladie; les documents fournis par ces auteurs sont encore trop insuffisants pour permettre un jugement.

Enfin plusieurs observations ont mis en lumière le rôle du *Balantidium coli*, infusoire cilié de l'intestin du porc, dans la pathogenèse de certaines colites catarrhales et ulcéreuses évoluant sous une apparence dysentériforme; cette question est encore à l'étude.

Ne retenant que les faits aujourd'hui bien établis, il faut se borner à reconnaître que l'ancienne conception unitaire de la dysenterie cesse de répondre à la réalité; il y a non pas une dysenterie, mais des dysenteries. Jusqu'à plus ample informé, on doit admettre, à côté de la forme amibienne dont l'existence ne semble plus contestable, une deuxième forme bien individualisée par sa cause bacillaire, son évolution clinique, ses caractères épidémiologiques. Cette dysenterie bacillaire est plus commune que la dysenterie amibienne, même dans les pays chauds; elle paraît régner seule dans nos régions tempérées. Les conditions de son étiologie ne sont pas encore exactement connues. On sait que, une fois développée, la maladie est facilement transmissible d'une manière directe ou indirecte, parfois même très contagieuse dans les milieux ruraux et les armées en campagne; mais on ignore comment naissent les cas initiaux et ceux qui ne relèvent pas de la contagion. L'usage de certaines eaux de boisson a été de tout temps incriminé en raison de faits dont l'importance ne saurait être méconnue. C'est aussi l'infection par l'eau de boisson que Strong et Musgrave considèrent comme la cause probable de la dysenterie à Manille, et Duprey[1] a donné le nom de « Water-borne disease » à l'épidémie qui éclata en 1901 dans l'île de Grenade. Cette opinion suppose la présence éventuelle du bacille spécifique dans les eaux utilisées pour l'alimentation, ce qui peut être établi par les procédés actuels de recherches.

Schmiedicke aurait rencontré le bacille dysentérique dans un puits du casino des officiers au camp de Döberitz où sévissait une épidémie; mais ce puits ne servait pas au personnel du camp. Drigalski estime que sa contamination a pu être effectuée par les fèces ou les linges de la famille de l'économe qui avait

1. Duprey, *The journal of tropical medecine*, 1902.

compté des malades probablement atteints de dysenterie. Le fait n'en est pas moins intéressant au point de vue de la prophylaxie. Il est à prévoir que la connaissance de la cause dysentérique permettra désormais d'aborder avec fruit l'étude étiologique de l'affection.

EXPLICATION DES PLANCHES X A XIII

PLANCHE X. — Fig. 1 : *Lapin; colon descendant;* hyperémie hémorragique de la muqueuse avec foyers confluents de nécrose (2).

FIG. 2. — *Lapin : gros intestin :* b, replis tuméfiés; a, foyers de nécrose.

FIG. 3. — *Chien; rectum;* a, foyers confluents de nécrose.

FIG. 4. — *Lésions provoquées par la toxine.* Lapin ; gros intestin. A, muqueuse ; V, vaisseaux dilatés et gorgés de sang; E, glandes de Lieberkuhn ; O, tissu adénoïde œdématié et infiltré de leucocytes; B, lymphatiques; c, celluleuse hémorragiée ; D, musculeuse.

PLANCHE XI. — FIG. 1. *Dysenterie du Chien ;* coupe au niveau d'un ulcère ; a, muqueuse ulcérée ; musculeuse de la muqueuse envahie par l'ulcère; c, celluleuse, altérations vasculaires, foyers hémorragiques.

FIG. 2. — *Lapin : gros intestin.* M, muqueuse desquamée de son revêtement épithélial et dont le tissu adénoïde est envahi par une nappe hémorragique.

PLANCHE XII. — FIG. 1. *Dysenterie humaine ;* coupe d'un ulcère.

FIGURE 2. — *Lapin gros intestin ;* coupe au niveau d'un îlot de sphacèle, M, muqueuse ; F, musculeuse ; c, celluleuse ; v, vaisseaux ; S, partie nécrosée ; T, glande de Lieberkuhn.

PLANCHE XIII. — FIG. 1. *Chien; gros intestin.* M. muqueuse; a, surface nécrosée; d, tissu adénoïde œdématié ; b, cul de sac glandulaire dilaté montrant les altérations de l'epithélium ; V, vaisseaux dilatés ; F, musculeuse ; c, celluleuse.

FIG 2. — *Lapin; muqueuse du gros intestin.* a, surface de la muqueuse sphacélée envahie par des bactéries, mélangées au bac. dysentérique ; b, partie sous-jacente montrant les îlots et les traînées du bac. dysentérique à l'état de pureté.

FIG 3. — *Même coupe.* a, bac dysentériques dans des portions de tubes glandulaires.

ÉTUDES SUR LES MICROBES NITRIFICATEURS

PAR MM.

E. BOULLANGER ET L. MASSOL

Chef de laboratoire à l'Institut Pasteur de Lille. Préparateur à l'Institut Pasteur de Lille.

Les remarquables travaux de Winogradsky [1] sur les organismes de la nitrification ont fait connaître les importantes fonctions physiologiques de ces microbes. Les recherches effectuées dans la voie si magistralement tracée par ce savant ont été cependant peu nombreuses. En effet, par suite des difficultés assez grandes qu'on rencontre dans l'isolement et la culture des microbes nitrifiants, certains auteurs furent conduits à des résultats erronés, et les conclusions de Winogradsky furent d'abord fortement contestées, notamment en Allemagne par Stutzer, Burri et Hartleb [2]. Nous savons aujourd'hui que les erreurs commises par ces expérimentateurs n'ont eu pour cause que la présence de microbes étrangers dans les cultures qu'ils considéraient comme pures, et que la théorie donnée par Winogradsky est bien la seule qui permette l'étude des propriétés physiologiques des organismes nitrificateurs.

Nous possédons déjà, par les travaux de Winogradsky [3], Oméliansky [3], Godlewski [4], un grand nombre de renseignements très précieux sur les caractères des ferments nitreux et du ferment nitrique, et ces recherches présentent aujourd'hui un intérêt d'autant plus considérable qu'une des plus importantes questions de l'hygiène moderne, celle de l'épuration des eaux résiduaires, repose en grande partie sur les fonctions vitales de ces organismes. C'est comme contribution à cette étude que nous apportons, dans le présent travail, les résultats de nos premières expériences sur les ferments nitrificateurs purs isolés de terres diverses et de lits bactériens d'épuration en activité.

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, années 1890 et 1891.
2. *Centralblatt fur Bakteriologie*, années 1895-1898.
3. *Archives des Sciences biologiques de Saint-Pétersbourg*. T. VII. 1899.
4. *Anzeiger der Akad. d. Wissens, in Krakau*. Juin 1865.

I

Les méthodes que nous avons suivies pour l'isolement des organismes de la nitrification sont celles qui découlent des travaux de Winogradsky et qui ont été décrites il y a quelques années par son collaborateur Oméliansky [1]. Il est inutile de reproduire ici ce que chacun pourra trouver dans le mémoire original de cet auteur, mais, comme la question présente une grande importance pour ceux qui veulent entreprendre des études sur les microbes nitrificateurs, nous indiquerons les observations que nous avons faites au cours de l'isolement des ferments, les difficultés que nous avons rencontrées dans l'application des méthodes, et les moyens de les éviter.

Pour isoler les ferments nitrificateurs, il faut commencer par provoquer une nitrification active avec la terre ou les fragments de lits bactériens qui doivent servir de souche. Cette nitrification est quelquefois longue à se déclarer, surtout avec certaines terres. Nous avons employé une méthode qui permet de hâter beaucoup le départ du phénomène. Elle consiste à remplir à moitié des fioles coniques d'Erlenmeyer de 250 c. c. avec des scories cassées en petits morceaux. Pour les ferments nitreux, on ajoute alors 50 c. c. du liquide de culture suivant, dont la composition est due à Oméliansky :

Sulfate d'ammoniaque	2 grammes.
Chlorure de sodium	2 —
Phosphate de potasse	1 gramme.
Sulfate de magnésie	0,5
Sulfate ferreux	0,4
Eau distillée	1,000 grammes.

Ce liquide vient baigner partiellement les fragments de scories. On stérilise, puis on ajoute environ 0 gr, 5 de carbonate de magnésie sous forme d'un lait stérile, et on ensemence avec une petite quantité de la terre d'expérience ou avec quelques morceaux de scories prélevés sur les lits bactériens en activité.

Pour le ferment nitrique, on procède exactement de la même manière, mais en employant comme liquide de culture la solution nitritée d'Oméliansky, dont nous rappelons la composition :

1. *Archives des Sciences biologiques de Saint-Pétersbourg*. T. VII, 1899, p. 291.

Nitrite de soude	1 gramme.
Carbonate de soude (calc.)	1 —
Phosphate de potasse	0,5 —
Chlorure de sodium	0,5 —
Sulfate ferreux	0,4 —
Sulfate de magnésie	0,3 —
Eau distillée	1,000 grammes.

On stérilise et on ensemence comme précédemment. Dans ces conditions, surtout si on a soin d'agiter les fioles trois ou quatre fois par jour pour mouiller les scories qui sont hors du liquide, la nitrification se déclare rapidement et devient aussitôt très intense.

En possession de ce liquide en pleine nitrification, on doit alors procéder, par les méthodes indiquées par Oméliansky, à des passages successifs dans les milieux précédents, de manière à éliminer le plus possible les microbes étrangers, et à obtenir une culture purifiée qui servira à l'isolement. Nous avons constaté qu'on a intérêt à pousser assez loin ces passages, car la séparation ultérieure des ferments nitrificateurs est d'autant plus facile que la culture employée est déjà plus pure.

La préparation de la silice gélatineuse, qui sert pour l'isolement du ferment nitreux, demande quelques précautions spéciales. On prépare d'abord la solution de silice, d'après les principes donnés par Oméliansky, en versant lentement dans 125 c. c. d'acide chlorhydrique à 13° B. un volume égal d'une solution à 8° B. de silicate de potasse ou de soude bien pur. On soumet alors le mélange à la dialyse.

La principale difficulté qu'on rencontre dans cette préparation est la coagulation prématurée de la silice, quelquefois dans le dialyseur, et plus souvent au moment de la stérilisation à 120°. Nous avons eu au début d'assez nombreux accidents de cette nature, et nous avons dû légèrement modifier notre technique pour les éviter. Les principaux facteurs qui influent sur le phénomène sont : la nature du parchemin, la quantité de l'eau employée pour la dialyse, la rapidité plus ou moins grande de cette dialyse, et le choix du moment où on opère la stérilisation.

Il faut d'abord avoir soin d'employer pour la dialyse un parchemin dont l'étanchéité a été bien éprouvée, si on veut maintenir la solution de silice au degré de concentration utile.

Quand on emploie pour cet usage du parchemin animal, il est nécessaire de plonger au préalable le dialyseur monté dans de l'acide chlorhydrique étendu, et de laver ensuite à plusieurs reprises avec de l'eau distillée. Ces parchemins sont en effet presque toujours chargés de chaux, et, si, on n'a pas le soin d'éliminer d'abord cette base par un traitement à l'acide chlorhydrique, il arrive souvent que la présence des sels de chaux dans la liqueur silicique occasionne des coagulations.

La nature de l'eau employée pour la dialyse intervient aussi. On peut parfaitement dialyser dans l'eau du robinet pendant les 24 premières heures, quand cette eau est assez pauvre en sels. Mais, quand l'eau dont on dispose est très calcaire, comme c'est le cas à Lille, il est préférable de dialyser à l'eau distillée : on évite ainsi bien des mécomptes.

La vitesse de la dialyse influe aussi beaucoup sur la stabilité du produit. L'acide chlorhydrique dialyse plus vite que le chlorure de potassium formé, et il importe de ne pas enlever trop rapidement cet excès d'acide chlorhydrique qui empêche au début l'action nuisible de la grande quantité de chlorure présent dans le liquide. Il faut donc avoir soin de retarder au commencement la dialyse de l'acide chlorhydrique en soumettant le dialyseur à un courant d'eau très lent, pendant les 20 premières heures. Quand la proportion de chlorure de potassium est devenue faible, on doit alors augmenter la vitesse du courant d'eau pour ne pas prolonger trop longtemps la dialyse.

Enfin, il faut bien choisir le moment propice pour la stérilisation. Le liquide ne doit plus donner qu'une réaction imperceptible à l'azotate d'argent. Cependant, ce caractère ne fournit pas des renseignements bien précis et il vaut mieux procéder à des essais de stérilisation à intervalles réguliers. Si on stérilise trop tôt, la petite quantité de sels encore présente détermine la coagulation à l'autoclave; si on stérilise trop tard, on prolonge trop longtemps la dialyse de ce produit instable et on risque d'avoir des échecs. Pour éviter cet inconvénient, il suffit de prélever, toutes les 3 heures, après 48 heures, 5 c. c. de la solution silicique et de la stériliser 10 minutes à 120°. On constate ainsi généralement qu'après 48 heures le produit ne supporte pas encore la stérilisation, tandis qu'au bout de 52-56 heures, la coagulation n'est plus à craindre. Le liquide devient de nou-

veau plus sensible si l'on allonge la durée de la dialyse. Le moment auquel la stérilisation s'effectue le mieux est assez variable, et les essais de chauffage à l'autoclave rendent sous ce rapport de grands services.

En prenant les précautions que nous venons d'indiquer, on arrive à préparer, sans difficultés et à coup sûr, une solution de silice qui supporte parfaitement la stérilisation à 120° pendant 10 minutes. Par addition des solutions salines indiquées par Oméliansky, cette silice fait prise en un temps qui varie entre 15 et 45 minutes.

Pour la culture du ferment nitreux sur cette silice, nous avons utilisé les excellents préceptes d'Oméliansky, qui permettent d'arriver très sûrement au but. Avant que la gélatinisation de la silice soit effectuée, on ensemence avec une anse de platine trempée dans la culture purifiée de ferment nitreux, on agite et on verse dans des boîtes de Pétri flambées où le milieu fait prise. Il est bon de placer les plaques sur un banc de verre dans des cristallisoirs flambés, contenant un peu d'eau stérile, pour éviter la dessiccation de la silice pendant la culture, qui demande parfois un temps assez long. On pique les colonies formées avec un fil de verre, dont on casse la pointe dans des matras contenant 25 c. c. du liquide nutritif pour les ferments nitreux, liquide dont nous avons donné la composition plus haut. Au bout de quelques jours la nitrification se déclare; il ne reste plus qu'à vérifier au microscope l'homogénéité de la culture et à procéder à l'épreuve de l'ensemencement dans le bouillon. Les tubes de bouillon doivent rester indéfiniment stériles.

L'isolement du ferment nitrique est beaucoup plus aisé. L'emploi de la gélose nitritée, préconisée par Winogradsky[1] permet d'arriver rapidement au but. Le contrôle de la pureté doit être fait au microscope et au bouillon, dans lequel aucun développement ne doit se produire.

Nous avons ainsi isolé par ces méthodes deux ferments nitreux purs, l'un provenant d'une terre de Java, qui nous a été obligeamment envoyée par M. le Dr Deutmann, de Batavia, et l'autre d'un lit bactérien d'épuration en activité; et deux ferments nitriques purs, l'un d'une terre de bruyère, et l'autre d'un lit bactérien.

1. *Centralblatt fur Bakteriologie*. T. II, p. 425. 1896.

II

Les deux ferments nitreux que nous avons étudiés se ressemblent beaucoup au point de vue morphologique : ce sont de belles bactéries ovales, ciliées, se présentant le plus souvent sous formes zoogléiques englobées dans les masses de carbonate de magnésie. Le ferment de lit bactérien nous a semblé cependant plus petit; il est également moins actif. Les deux ferments nitriques ne présentent pas non plus de différences de structure; ce sont bien les bactéries très petites, décrites par Winogradsky, formant sous le microscope des amas plus ou moins denses.

La grande fragilité de ces ferments nitrificateurs, déjà signaée par Winogradsky et Oméliansky, rend les expériences assez délicates. On a parfois des irrégularités inexplicables dans le développement des microbes, principalement pour le ferment nitreux, et la période appelée par Winogradsky période d'incubation, qui s'écoule entre l'ensemencement et l'apparition de la réaction nitreuse, varie dans des limites assez considérables. Aussi est-il nécessaire d'apporter le plus grand soin au choix de la semence, et d'employer toujours, pour les ensemencements d'une même expérience, des doses égales d'une même culture, rendue aussi homogène que possible. Nous avons employé ordinairement, pour le ferment nitreux, dans les essais qui vont suivre, 0,5 c. c. de semence par 20 c. c. de milieu de culture. Cette dose assez forte a l'avantage de réduire la durée de la période d'incubation et de rendre exceptionnelles les irrégularités dans le développement des microbes et dans la durée de la nitrification. Ces irrégularités n'existent pas avec le ferment nitrique, et trois gouttes d'une semence jeune suffisent par assurer des nitrifications régulières et tout à fait comparables.

Pour apprécier la marche de la nitrification, nous avons recherché l'ammoniaque au moyen du réactif de Nessler, les nitrites avec le réactif de Trommsdorff (iod-amylique), les nitrates avec le sulfate de diphénylamine. Il importe toutefois de remarquer que les nitrites donnent avec ce dernier réactif la coloration bleue comme les nitrates, et quand on veut rechercher les nitrates dans les solutions nitritées, il est nécessaire de détruire au préalable les nitrites par ébullition avec un peu de

sulfate de protoxyde de fer, qui les décompose en dégageant du bioxyde d'azote. On fait alors agir le sulfate de diphénylamine.

Nous passons maintenant aux diverses expériences entreprises sur les ferments nitrificateurs.

Résistance à la chaleur. — Nous avons recherché quelle était l'action de la chaleur sur ces organismes. Pour éviter une trop longue période d'incubation de la culture après chauffage, il faut ensemencer assez fortement. Pour cela, nous avons enfermé les microbes dans de longs tubes très fins, plusieurs fois contournés en S, et renfermant environ 1 c. c. de culture. Ces tubes ont été plongés, pendant un temps rigoureusement déterminé, dans un grand bain-marie contenant 12 litres d'eau à la température voulue. Après chauffage, on a refroidi brusquement et ensemencé la culture dans 25 c. c. de milieu ammoniacal ou nitrité, suivant la nature du microbe, et les cultures qui après deux mois de séjour à l'étuve à 30°, n'ont donné aucune trace de nitrification, ont été considérées comme mortes. Voici nos résultats :

Températures.	Durée du chauffage.	Ferments nitreux.	Ferments nitriques.
35°	5 minutes.	+	+
40°	—	+	+
45°	—	0	+
50°	—	0	+
55°	—	0	0
60°	—	0	0

+, développement; 0, mort.

On voit donc que nos deux ferments nitreux sont très sensibles à l'action de la chaleur, puisque ils meurent après cinq minutes à 45°. Les deux ferments nitriques sont plus résistants et ne sont détruits qu'aux environs de 55°.

Température optima de culture. — Pour nous rendre compte de la température la plus favorable pour le développement de ces organismes, nous avons procédé à une série de cultures aux températures de 20°, 30°, 37° et 45°. 20 c. c. de solution ammoniacale ou nitritée ont été ensemencés avec les ferments nitreux de Java et de Lit bactérien, et avec les ferments nitriques de Lit bactérien et de Bruyère. Le tableau suivant indique la durée de la nitrification aux diverses températures :

Températures.	FERMENTS NITREUX		FERMENTS NITRIQUES	
	Java.	Lit bactérien.	Bruyère.	Lit bactérien.
20°	37 jours.	40 jours.	20 jours.	27 jours.
30°	24 —	25 —	11 —	11 —
37°	20 —	24 —	8 —	8 —
45°	Pas de nitrification.			

La température la plus favorable paraît donc être celle de 37° pour les ferments nitreux comme pour les ferments nitriques. A 20° l'action est beaucoup plus lente; elle est nulle à 45°.

Influence de divers supports. — Nous avons déjà signalé, à propos de l'isolement des microbes, l'influence favorisante des scories sur la nitrification. Pour étudier cette action sur le ferment nitreux, nous avons placé dans des fioles coniques d'un litre 400 c. c. de solution minérale d'Oméliansky sans ammoniaque. Certains flacons ont alors été remplis à moitié avec des scories, d'autres n'ont reçu aucune addition. Après stérilisation, on a ajouté l'ammoniaque sous forme d'une solution de sulfate d'ammoniaque à 10 0/0. Cette précaution est nécessaire pour ne pas avoir de déperdition d'ammoniaque pendant le chauffage à l'autoclave. Le liquide arrivait environ à mi-hauteur de la couche de scories dans les flacons. On a ensemencé les deux ferments nitreux Java et Lit bactérien; de temps à autre, on agitait les matras pour mouiller les scories situées hors du liquide. Voici les résultats obtenus :

	Ferment nitreux.	Durée de la nitrification.
Java.	Sans scories (milieu liquide)	29 jours.
	Avec scories	20 —
Lit bactérien.	Sans scories (milieu liquide)	47 jours.
	Avec scories	37 —

On voit que la présence des scories réduit environ d'un tiers la durée du phénomène.

En présence de ces résultats, nous avons étudié l'influence de divers supports sur les ferments nitreux et nitriques. Le mode opératoire a été le même que précédemment, mais nous n'avons employé cette fois que 50 c. c. de liquide ammoniacal ou nitrité. Nos essais ont porté sur les scories, la porcelaine poreuse, la ponce, la brique et le sable. Voici nos résultats :

Supports.	DURÉE DE LA NITRIFICATION	
	Ferment nitreux Java.	Ferment nitrique Bruyère.
Scories	18 jours.	8 jours.
Porcelaine poreuse	22 —	13 —
Ponce	23 —	13 —
Brique	28 —	13 —
Sable	34 —	12 —
Témoin (sans support)	28 —	12 —

Nous voyons que les scories constituent, pour le ferment nitreux comme pour le ferment nitrique, le support le plus favo-

rable. Le ferment nitreux est particulièrement aidé par la présence de certaines substances telles que la porcelaine poreuse et la ponce. Le fait d'exposer le liquide nitrifiable au contact de l'air sous la très large surface offerte par les aspérités des scories et de la ponce augmente l'activité du ferment nitreux et la vitesse de la nitrification. Le ferment nitrique est moins sensible à ces influences : à part les scories dont l'action est indiscutable, les autres substances paraissent indifférentes, sinon nuisibles. Il faut remarquer également que le sable paraît peu favorable à la fermentation nitreuse; nous avons pu à plusieurs reprises nous convaincre que les matras contenant du sable nitrifiaient moins vite l'ammoniaque que les autres matras.

Un excellent procédé de culture pour le ferment nitreux consiste à le cultiver sur scories en tonneaux roulants, comme on cultive le ferment acétique sur les copeaux dans les acétificateurs rotatifs du procédé Luxembourgeois pour la fabrication du vinaigre. On remplit complètement de scories de petits tonneaux en verre d'environ deux litres, on ajoute une certaine proportion de milieu à nitrifier, proportion qui doit au plus atteindre le tiers de la capacité du fût, on stérilise et on ensemence. On fait alors passer par la tubulure centrale un courant d'air stérile très lent, et toutes les trois ou six heures on procède à une révolution du tonneau pour imbiber les scories et activer le phénomène. Dans ces *nitrificateurs rotatifs*, le phénomène est très rapide, et, en ajoutant progressivement de nouvelles doses d'ammoniaque au fur et à mesure de sa disparition, on arrive à nitrifier des quantités considérables. Voici par exemple le résultat d'une expérience de cette nature :

	Durée de la nitrification.	Nitrite formé.
Milieu liquide................	54 jours.	7 gr. 8 par litre.
Tonneau roulant avec scories.	54 —	10 — 9 —

Nous voyons qu'on peut obtenir par ce mode de culture une production de nitrites déjà assez élevée. Nous allons retrouver ces faits en étudiant l'influence de la concentration saline sur les microbes.

III

Influence de la concentration saline sur les ferments nitrificateurs. — Il est particulièrement intéressant, pour l'étude des

fonctions physiologiques des ferments nitrificateurs, de connaître l'influence de la proportion de sel oxydable (sulfate d'ammoniaque ou nitrite de soude) sur la marche de la nitrification, et l'action du produit oxydé (nitrite ou nitrate), formé par les microbes.

Dans ce but, nous avons cherché à résoudre les questions suivantes :

1° Quelle est l'action de la concentration du milieu en sulfate d'ammoniaque sur la fermentation nitreuse, et en nitrite de soude sur la fermentation nitrique ?

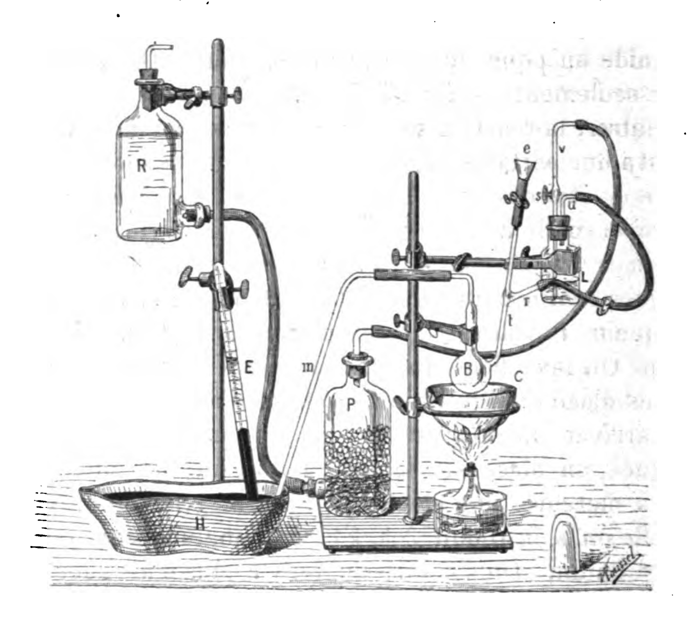
2° Quelle est l'influence du nitrite de soude formé sur le ferment nitreux, et du nitrate de soude sur le ferment nitrique?

3° Les nitrates produits par le ferment nitrique exercent-ils une action sur la marche du ferment nitreux?

Méthodes de dosage. — Pour faire ces expériences, il est nécessaire d'avoir une méthode de dosage très précise des nitrites, des nitrates et de ces deux sels réunis. Les procédés colorimétriques ne sont pas susceptibles d'une assez grande exactitude. Nous devons à l'extrême obligeance de M. Muntz une méthode très élégante de dosage qui permet d'apprécier avec une grande exactitude des quantités très petites de nitrites ou de nitrates, ou des mélanges de ces deux sels. Comme cette méthode de M. Muntz n'a pas été publiée, nous en donnerons la description ici, car elle est susceptible de rendre de très grands services à ceux qui s'occupent de nitrification.

Les dosages se font d'après le principe de la méthode de Schlœsing, qui consiste à transformer les nitrates en bioxyde d'azote qu'on recueille et qu'on mesure sur le mercure. Pour doser les nitrites, on se base sur ce fait que ces sels, chauffés avec du sulfate ferreux, se décomposent intégralement en donnant du bioxyde d'azote. Dans ces conditions, les nitrates ne sont pas attaqués. Si on additionne alors le liquide d'acide chlorhydrique quand les nitrites sont détruits, les nitrates sont décomposés à leur tour, et tout l'azote qu'ils contiennent se dégage à l'état de bioxyde d'azote. Il suffit donc, en pratique, d'introduire d'abord dans le ballon du sulfate ferreux au contact de la liqueur dans laquelle on veut doser les nitrites; on chauffe, et on recueille le bioxyde d'azote dans une première cloche. Cette réaction s'achève très rapidement. Quand le dégagement

de gaz a cessé, on change de cloche et on fait arriver de l'acide chlorhydrique au contact du liquide. Les nitrates sont décomposés à leur tour, et on recueille le bioxyde d'azote dans la deuxième cloche. On obtient ainsi séparément, mais dans une même opération, le bioxyde d'azote correspondant aux nitrites et aux nitrates, et on en déduit la proportion de ces sels présente dans la liqueur.



L'appareil qui sert pour ces dosages est l'appareil de Schlœsing légèrement modifié, et se trouve représenté ci-contre :

Le petit ballon B dans lequel s'effectuent les réactions contient seulement environ 30 à 35 c. c. La tubulure supérieure sert au dégagement des gaz et est reliée au tube abducteur qui s'ouvre sous la cuve à mercure. Au centre du ballon se trouve une deuxième tubulure, qui porte un tube vertical assez fin. Ce tube se bifurque bientôt en donnant deux branches : l'une est reliée par un fort caoutchouc muni d'une pince à un très petit entonnoir qui sert à l'introduction des liquides; l'autre est reliée à un appareil continu R P, producteur d'acide carbonique. Le chauffage s'opère en plongeant le petit ballon dans un bain de paraffine ou d'alliage de Wood maintenu à la température voulue par une lampe à alcool. Ce mode de chauffage est très pratique, car il

empêche la surchauffe et les absorptions qui arrivent parfois avec le chauffage direct par la lampe à alcool. En outre, le support du bain d'alliage porte un manche en bois pour abaisser ou élever facilement ce bain ; on peut ainsi produire à volonté dans l'appareil de légères dépressions qui permettent d'introduire sans difficulté les liquides par le petit entonnoir pendant l'opération.

Voici comment s'exécute l'analyse. Il faut d'abord amener le liquide au point de concentration voulu. Quand il s'agit de doser seulement les nitrites, il n'est pas nécessaire de beaucoup concentrer, la réaction se produisant très bien en milieu étendu. Ce fait a une certaine importance, car certains nitrites, comme le nitrite de magnésium, sont très instables, et leurs solutions se décomposent déjà partiellement à 100°. Pour les nitrates, il est nécessaire de concentrer de manière à avoir, sous un volume de quelques centimètres cubes, 10 à 20 milligrammes de nitrate. La liqueur d'essai est introduite par le petit entonnoir dans le ballon. On lave l'entonnoir à plusieurs reprises avec quelques gouttes d'eau distillée, puis on chasse l'air de l'appareil en faisant arriver un courant de gaz carbonique. Cette opération effectuée, on place sur le tube abducteur, qui plonge dans la cuve à mercure, une cloche de 25 c. c. graduée au 1/10, dans laquelle on a introduit 3 à 4 c. c. d'une solution de potasse à 39-40° Baumé. On s'assure qu'il n'y a plus d'air dans l'appareil en faisant passer encore deux ou trois bulles de gaz carbonique, qui doivent être entièrement absorbées par la potasse. On fait alors entrer dans l'appareil par le petit entonnoir, en produisant une légère dépression, 1 à 2 c. c. d'une solution saturée de sulfate ferreux. On lave à plusieurs reprises et on chauffe le bain d'alliage. Le bioxyde d'azote se dégage. Quand le dégagement gazeux paraît terminé, on fait passer bulle à bulle, sans arrêter l'ébullition, un courant de gaz carbonique pour balayer l'appareil et entraîner tout le bioxyde d'azote. On enlève cette première cloche.

On place alors sur le tube abducteur une deuxième cloche, puis, en abaissant un peu le bain d'alliage, on crée une légère dépression et on fait arriver par le petit entonnoir 2 à 3 c. c. d'acide chlorhydrique. On plonge de nouveau le ballon dans le bain d'alliage, et le bioxyde d'azote des nitrates se dégage à son

tour. L'appareil est balayé à la fin comme précédemment par un courant de gaz carbonique.

On obtient ainsi deux cloches de gaz qu'on plonge dans une petite cuve à mercure profonde pour les mettre en équilibre de température avec le mercure qui les entoure, et pour permettre à la potasse d'achever d'absorber l'acide carbonique. On amène alors le mercure au même niveau dans les cloches et dans la cuvette, afin de n'avoir comme contre-pression que la colonne de potasse. On note le volume du gaz, la température, la hauteur de la colonne de potasse et la pression barométrique. Pour les calculs, on admet que la tension de vapeur de la solution de potasse est sensiblement égale aux deux tiers de la tension de la vapeur d'eau à la même température, et que sa densité est dix fois moindre que celle du mercure, c'est-à-dire qu'une colonne de 4 centimètres de potasse correspond à une colonne de mercure de 4 millimètres. Il suffit alors de ramener les volumes gazeux à 0° et 760% et on en déduit le nitrite et le nitrate correspondants [1].

Toutes les analyses exécutées dans ce travail l'ont été par cette méthode de M. Muntz, à qui nous sommes heureux de pouvoir exprimer ici tous nos remerciements.

EXPÉRIENCES SUR LES FERMENTS NITREUX

Influence de la concentration en ammoniaque. — Pour étudier l'action de la concentration du milieu en ammoniaque sur la fermentation nitreuse, nous avons préparé les solutions minérales nutritives ordinaires dans lesquelles nous avons ajouté des proportions variables de sulfate d'ammoniaque. Chaque

1. Voici un exemple de calculs :

Volume de gaz obtenu	Pour le nitrite.	c. c.	2,55
	Pour le nitrate.	—	9,6
Température t			21°
Pression H corrigée et réduite à 0°		mm.	763,8
Hauteur h de la colonne de potasse	Pour le nitrite.	—	42
	Pour le nitrate.	—	53
Pression du gaz dans la cloche.	Pour le nitrite.	—	747,3
$H - \frac{1}{10} h - \frac{2}{3} f_t$	Pour le nitrate.	—	746,2

(f_t tension de la vapeur d'eau à la température t.)

Volume du gaz réduit à 0° et 760 mm.	Pour le nitrite.	c. c.	2,33
	Pour le nitrate.	—	8,75
Sels correspondants	Nitrite de soude.	mg.	7,18
	Nitrate de soude.	mg.	33,24

matras a reçu 20 c. c. de milieu de culture et, après stérilisation, nous avons additionné ce milieu de la quantité de carbonate de magnésie correspondant à la dose d'ammoniaque présente. L'expérience a porté sur les deux ferments Java et Lit bactérien. L'ensemencement a eu lieu le 15 novembre, et on a relevé les réactions au Trommsdorff et au Nessler aux diverses époques.

Le 13 janvier, soit environ 2 mois après, constatant que la réaction au Nessler était toujours aussi intense dans les milieux qui contiennent plus de 6 grammes par litre de sulfate d'ammoniaque, nous avons sacrifié les cultures et nous avons soumis les liquides à l'analyse pour voir quelle avait été la production de nitrite dans les milieux riches en sulfate d'ammoniaque. Les résultats obtenus ont été les suivants :

SULFATE D'AMMONIAQUE EN grammes par litre.	NITRITE DE MAGNÉSIE FORMÉ EN GR. PAR LITRE	
	FERMENT JAVA	FERMENT LIT BACTÉRIEN
8	6,48	»
10	6,61	4,86
30	8,34	9,61
50	7,59	traces
80	traces	traces
100	traces	traces

Ces résultats nous permettent de tirer les conclusions suivantes : le ferment nitreux s'arrête quand la concentration en sulfate d'ammoniaque dépasse 50 grammes par litre. Il existe d'ailleurs sous ce rapport des différecnes entre les divers ferments. Avec le ferment Java, il y a encore nitrification jusqu'à 50 grammes par litre; avec le ferment Lit bactérien, la nitrification s'arrête lorsque la proportion de sulfate d'ammoniaque atteint 30 grammes par litre.

Influence du nitrite formé. — Pour voir quelle est l'influence du nitrite formé sur la fermentation nitreuse, nous avons dû nous mettre à l'abri de l'action nocive des doses trop fortes d'ammoniaque. A cet effet, nous avons cultivé les ferments nitreux dans le milieu normal à 2 0/00 de sulfate d'ammoniaque, et, chaque fois que la réaction ammoniacale disparaissait, nous rajoutions une dose d'ammoniaque équivalente à celle qui avait

disparu, ainsi que la dose de base carbonatée correspondante. Nous avons pu produire ainsi une accumulation de nitrite assez considérable, tout en ne nitrifiant que des solutions ammoniacales étendues. Les essais ont été effectués sur 100 c. c. de milieu minéral contenant 2 grammes par litre de sulfate d'ammoniaque. Les doses successives d'ammoniaque étaient ajoutées sous forme de 1 c. c. d'une solution de sulfate d'ammoniaque à 20 0/0 stérilisée, dès que la réaction au Nessler avait disparu. A chaque dose d'ammoniaque, on ajoutait 4 c. c. d'un lait à 10 0/0 de carbonate de magnésie stérilisé. Nous avons expérimenté sur les deux ferments Java et Lit bactérien; l'ensemencement a eu lieu le 6 décembre, et les résultats obtenus ont été les suivants :

FERMENTS	DATES DES DIVERSES DOSES AJOUTÉES								
	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°
Java.......	6 déc.	23 déc.	2 janv.	7 janv.	12 janv.	16 janv.	2 févr.	4 mars	16 avril
Lit bactérien.	6 déc.	20 déc.	29 déc.	7 janv.	14 janv.	2 févr.	23 mars	»	»

Le 19 mars, voyant la nitrification se ralentir, nous avons rajouté la dose de sels nutritifs contenue dans le milieu primitif, pour être certains que l'arrêt ne tenait pas au manque des éléments minéraux indispensables. Cette addition n'a eu aucun résultat.

Nous voyons donc que la nitrification a marché régulièrement, avec le ferment Java jusqu'à la 6e dose d'ammoniaque, ce qui correspond à la nitrification de 10 grammes de sulfate d'ammoniaque par litre. A partir de ce moment, le phénomène s'est beaucoup ralenti, il a déjà fallu 17 jours pour nitrifier complètement la 6e dose; la 7e dose a demandé 1 mois, la 8e dose 1 mois et demi, la 9e dose n'a plus nitrifié.

Pour le ferment Lit bactérien, l'action est la même, mais ce ferment est décidément plus sensible aux concentrations fortes, comme nous l'avons déjà vu dans l'expérience précédente : il est gêné par le nitrite formé à partir de la 5e dose d'ammoniaque, et il s'arrête à la 7e dose.

Pour nous rendre compte des concentrations en nitrite qui correspondent à ces actions nuisibles, nous avons procédé au

dosage des nitrites dans les matras, avant l'addition de la 9e dose pour le ferment Java, et avant l'addition de la 7e dose pour le ferment Lit bactérien. Nous avons obtenu les chiffres suivants :

Ferment.	Nitrite de magnésie présent en gr. par litre
Java	14,31
Lit bactérien	13,42

Il importe de remarquer que ces chiffres ne peuvent pas correspondre exactement aux doses d'ammoniaque introduites. Il aurait fallu pour cela tenir compte de la concentration et des variations de volume à la suite des additions d'ammoniaque, ce que nous avons jugé inutile, car notre but n'était pas ici de déterminer la quantité de nitrite qui se forme pour une quantité donnée de sulfate d'ammoniaque, mais bien la quantité de nitrite capable de gêner et d'arrêter une fermentation nitreuse. On voit par ce qui précède qu'à partir de 8 à 10 grammes de nitrite de magnésie par litre, le ferment nitreux semble gêné, et son action est paralysée quand la proportion de nitrite formé atteint 13 à 15 grammes par litre. Cependant, le ferment n'est pas atteint dans sa vitalité, car, en diluant de moitié le liquide de culture après arrêt de la nitrification, nous avons constaté un nouveau départ et une nitrification complète de l'ammoniaque présente.

Nous avons également fait ces expériences en nous servant de carbonate de chaux, au lieu de carbonate de magnésie comme base carbonatée. Les nitrifications ont été moins loin, comme l'indique le tableau suivant :

FERMENTS	DATES DES DIVERSES DOSES AJOUTÉES					
	1°	2°	3°	4°	5°	6°
Java	6 déc.	20 déc.	2 janv.	16 janv.	30 janv.	9 mars.
Lit bactérien	6 déc.	23 déc.	20 janv.	7 févr.	4 mars.	»

La nitrification paraît donc plus gênée par le nitrite de chaux que par le nitrite de magnésie, puisqu'à la 6e dose d'ammoniaque pour le ferment de Java, et à la 5e dose pour le ferment de Lit bactérien, la nitrification a cessé de progresser. En diluant de moitié ces cultures, le phénomène a repris son cours normal.

Nous avons alors voulu voir si, en cultivant nos ferments en nitrificateurs rotatifs, comme nous l'avons indiqué plus haut,

nous n'arriverions pas à repousser plus loin cette dose à laquelle le nitrite formé devient nuisible. Nous avons placé dans de petits tonneaux en verre de deux litres, remplis de scories calcinées stérilisées, 700 c. c. de liquide minéral stérile à 2 grammes par litre de sulfate d'ammoniaque, et nous avons ensemencé avec les ferments Java et Lit bactérien. On faisait subir aux tonneaux deux révolutions complètes par jour, et la masse des scories était traversée par un courant d'air très lent. Chaque fois que l'on constatait dans la prise d'essai la disparition de l'ammoniaque, on ajoutait une nouvelle dose égale à la précédente et la dose de carbonate de magnésie correspondante. Voici les résultats obtenus :

FERMENTS	DATES DES DIVERSES DOSES AJOUTÉES								
	1o	2o	3o	4o	5o	6o	7o	8o	9o
Lit bactérien.	24 janv.	2 févr.	11 févr.	16 févr.	20 févr.	27 févr.	13 mars	23 mars	13 avril
Java........	24 janv.	5 févr.	11 févr.	16 févr.	20 févr.	27 févr.	4 mars	13 mars	13 avril

Le 22 mai, la réaction au Nessler était encore intense dans les deux tonneaux : la nitrification était arrêtée. Le dosage du nitrite de magnésie dans le milieu du ferment Lit bactérien a donné 15gr,15 par litre.

Nous arrivons donc ici aux mêmes conclusions que dans les expériences précédentes, mais il faut remarquer que la nitrification a été beaucoup plus rapide dans ces petits tonneaux roulants que dans les fioles coniques. Au moment où le phénomène était très actif, les ferments ont nitrifié en 4 jours 1gr,4 de sulfate d'ammoniaque.

Influence de l'addition de divers nitrites. — Les expériences que nous venons d'exposer montrent qu'au delà de 15 grammes par litre, les nitrites de magnésie ou de chaux formés deviennent nettement nuisibles à la fermentation nitreuse. Ce qui se passe est tout différent quand on ajoute, avant le départ de la fermentation nitreuse, une certaine dose de nitrite. A 20 c. c. de milieu normal à 2 grammes par litre de sulfate d'ammoniaque, nous avons ajouté des doses croissantes de divers nitrites, en solutions titrées stérilisées à froid à la bougie Chamberland, pour éviter toute décomposition à l'autoclave. Nous avons essayé les nitrites

de potasse, de soude, de chaux et de magnésie. La durée de la nitrification avec les doses variables de ces divers nitrites est indiquée par le tableau suivant :

Doses de nitrite en grammes par litre.	DURÉE DE LA NITRIFICATION					
	NITRITE DE SOUDE		NITRITE DE POTASSE		NITRITE DE CHAUX	NITRITE DE MAGNÉSIE
	Java.	Lit bact.	Java.	Lit. bact.	Java.	Java.
1	45 jours.	3 mois.	2 mois.	2 m. 1/2.	21 jours.	16 jours.
2	2 mois.	—	—	3 mois.	22 jours.	—
4	—	—	—	—	—	—
8	—	3 m. 1/2.	—	3 m. 1/2.	—	—
10	—	—	—	—	—	21 jours.

Durée de la nitrification des témoins sans addition de nitrites { Java.... 10 jours. / Lit bact.. 7 —

Nous constatons qu'une très faible quantité de nitrite de soude ou de potasse, ajoutée avant le départ de la fermentation nitreuse, gêne considérablement le développement du ferment ; puisqu'à la dose de 2 grammes par litre, la nitrification d'une même quantité d'ammoniaque demande pour le ferment Java 2 mois au lieu de 7 jours. Le ferment Lit bactérien est encore plus sensible. Ajoutons que nous avons préparé nous-mêmes ces nitrites à l'état pur, qu'ils nitrifient parfaitement par le ferment nitrique et qu'il ne peut pas s'agir de la présence d'une impureté antiseptique pour le microbe. Les nitrites de chaux et de magnésie, ajoutés avant l'ensemencement, gênent beaucoup moins que les nitrites de potasse et de soude, puisque le retard dans la nitrification n'est que de 14 jours pour le nitrite de chaux et de 9 jours pour le nitrite de magnésie. Il y a cependant une légère action nocive.

Influence de l'addition de divers nitrates. — En présence de ces résultats, nous avons voulu nous rendre compte si l'addition de nitrates produisait sur la fermentation nitreuse des actions analogues à celles que donnent les nitrites. Nous avons additionné le milieu minéral à 2 grammes par litre de sulfate d'ammoniaque de doses variables de divers nitrates (potasse, soude, magnésie, chaux). Les durées observées pour la nitrification d'une même dose d'ammoniaque ont été les suivantes :

Doses en gr. par litre.	DURÉE DE LA NITRIFICATION							
	NITRATE DE SOUDE		NITRATE DE POTASSE		NITRATE DE CHAUX		NITRATE DE MAGNÉSIE	
	Java.	Lit bact.	Java.	Lit bact.	Java.	Lit bact.	Java.	Lit bact.
1	30 jours.	pas finie.	19 jours.	2 m. 1/2.	19 jours.	2 mois.	19 jours.	2 mois.
5	pas finie.	—	30 jours.	3 mois.	19 jours.	2 mois.	19 jours.	2 mois.
10	—	—	pas finie.	pas finie.	19 jours.	2 mois.	19 jours.	2 mois.
50	—	—	—	—	pas finie.	pas finie.	pas finie.	pas finie.

Durée de la nitrification des témoins sans addition de nitrate { Java..... 19 jours. / Lit bact. 39 —

Nous voyons que le nitrate de soude, ajouté avant l'ensemencement, retarde déjà de 11 jours le ferment Java à la dose de 1 gramme par litre. A la dose de 5 grammes par litre et aux doses supérieures, la nitrification se manifeste un peu, car on a une réaction sensible au Trommsdorff, mais trois mois après l'ensemencement, il y a encore beaucoup d'ammoniaque. Le ferment Lit bactérien est beaucoup plus sensible, et la dose de 1 gramme par litre de nitrate de soude a suffi pour gêner sa multiplication.

Le nitrate de potasse gêne moins que le nitrate de soude. Pour le ferment Java, la dose de 1 gramme par litre est indifférente, celle de 5 grammes par litre retarde un peu le phénomène; au delà de 10 grammes par litre, la nitrification devient interminable. Le ferment Lit bactérien présente toujours sa sensibilité plus grande; cependant, il est moins gêné par le nitrate de potasse que par le nitrate de soude, puisqu'il termine sa nitrification en 3 mois dans le milieu à 5 grammes par litre de nitrate de potasse. Au delà de cette dose, la nitrification est faible, et il reste toujours de l'ammoniaque.

Le nitrate de chaux ne gêne le ferment Java qu'aux concentrations fortes, au delà de 10 grammes par litre. Au-dessous de ce chiffre, la durée de la nitrification est la même que dans le témoin. Il en est de même pour le nitrate de magnésie. Le ferment Lit bactérien est toujours plus gêné que le ferment Java. Cependant, il nitrifie complètement l'ammoniaque en présence de 10 grammes par litre de ces nitrates, mais avec un retard d'environ 20 jours sur le témoin.

Il résulte de ces diverses expériences que les nitrates de

soude et de potasse présents dans les liquides peuvent gêner notablement le développement des ferments nitreux même à une concentration assez faible (1 à 5 gr. par litre). Les nitrates de chaux ou de magnésie ne gênent que peu ou pas du tout, excepté aux concentrations fortes (plus de 10 gr. par litre).

EXPÉRIENCES SUR LES FERMENTS NITRIQUES

Influence de la concentration en nitrite de soude. — 20 c. c. de milieu minéral sont additionnés de doses de nitrite de soude variant de 1 gramme par litre à 100 grammes par litre. L'ensemencement a eu lieu le 9 novembre avec le ferment nitrique Bruyère : on a noté chaque jour la réaction au Trommsdorff jusqu'à transformation complète du nitrite. Le tableau suivant donne les réactions observées aux diverses époques.

NITRITE DE SOUDE en gr. par litre.	DATES				
	9 novembre.	17 novembre.	21 novembre.	7 décembre.	29 janvier.
1	+	O			
2	+	+	O		
5	+	+	+	O	
10	+	+	+	+	O
20	+	+	+	+	+
100	+	+	+	+	+

+, réaction intense au Trommsdorff; O, réaction nulle.

Nous constatons que la nitrification a été complète dans les milieux qui contiennent jusqu'à 10 grammes par litre de nitrite de soude. Elle a duré 9 jours pour le liquide à 1 0/00, 13 jours pour le liquide à 2 0/00, 29 jours pour le liquide à 5 0/00, 82 jours pour le liquide à 10 0/00. On constate que déjà pour une proportion de 10 grammes par litre de nitrite de soude, la nitrification se ralentit.

Les milieux renfermant respectivement 20 grammes et 100 grammes de nitrite de soude par litre donnaient encore 7 mois après une réaction intense au Trommsdorff. L'analyse a permis de reconnaître qu'il ne s'était formé que des traces de nitrates. Il n'y a donc pas de nitratation en présence d'une dose de 20 grammes par litre de nitrite. Nous n'avons pas pu arriver à produire la nitrification dans ce milieu, même en accoutumant

le microbe par cultures successives dans des milieux de plus en plus concentrés en nitrite. Nous voyons donc que le ferment nitrique est très sensible à la dose de nitrite présente, et qu'il présente sous ce rapport une sensibilité beaucoup plus grande que le ferment nitreux vis-à-vis de l'ammoniaque. Nous avons vu en effet la nitritation se produire avec le ferment nitreux dans des concentrations de sulfate d'ammoniaque de 50 grammes par litre.

Influence du nitrate formé. — Pour faire cette recherche, nous avons suivi le même mode opératoire que pour l'étude de l'influence du nitrite formé sur le ferment nitreux. Pour nous mettre à l'abri de l'influence nocive du nitrite, nous avons ensemencé les ferments nitriques dans le milieu minéral ordinaire à 1 gramme par litre de nitrite de soude, et, dès que la nitrification était complète, nous rajoutions une dose de nitrite équivalente à celle qui avait nitrifié. Nous avons ainsi pu produire une forte accumulation de nitrate dans le milieu de culture, tout en n'opérant que sur des solutions nitritées étendues. Les additions de nitrite se faisaient au moyen d'un volume donné d'une

DATES DES DIVERSES DOSES AJOUTÉES :							
FERMENTS	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°
Bruyère.....	20 oct.	1er nov.	9 nov.	17 nov.	25 nov.	29 nov.	2 déc.
Lit bactérien.	20 oct.	1er nov.	9 nov.	17 nov.	25 nov.	29 nov.	2 déc.
FERMENTS	8°	9°	10°	11°	12°	13°	14°
Bruyère.....	5 déc.	11 déc.	15 déc.	22 déc.	26 déc.	29 déc.	2 janv.
Lit bactérien.	5 déc.	11 déc.	15 déc.	22 déc.	26 déc.	29 déc.	2 janv.
FERMENTS	15°	16°	17°	18°	19°	20°	21°
Bruyère.....	7 janv.	22 janv.	28 janv.	6 févr.	16 févr.	20 févr.	25 févr.
Lit bactérien.	7 janv.	11 janv.	16 janv.	22 janv.	26 janv.	30 janv.	5 févr.
FERMENTS	22°	23°	24°	25°	26°		
Bruyère.....	5 mars.	12 mars.	17 mars.	21 mars.	28 mars.		
Lit bactérien.	8 févr.	14 févr.	20 févr.	5 mars.	»		

solution de nitrite de soude à 10 0/0 stérilisée. Nous avons expérimenté avec les ferments Bruyère et Lit bactérien. L'ensemencement a eu lieu le 20 octobre et le tableau ci-joint résume la marche des deux ferments.

Nous voyons que l'oxydation du nitrite s'est poursuivie régulièrement et avec une grande activité jusqu'à l'addition de la 26e dose de nitrite de soude pour le ferment Bruyère. A ce moment, qui correspond à l'oxydation de 26 grammes de nitrite par litre, la production de nitrates s'est complètement arrêtée. Les résultats ont été analogues avec le ferment Lit bactérien, dont la marche a été encore plus régulière : elle s'est brusquement interrompue à la vingt-cinquième dose de nitrite.

Pour nous rendre compte de la concentration en nitrate qui correspond à cet arrêt, nous avons procédé à l'analyse et nous avons obtenu les chiffres suivants :

Ferment.	Nitrate formé en gr. par litre
Bruyère	25,57
Lit bactérien	24,84

Dans cette expérience, comme dans celle qui se rapporte à l'action du nitrite de soude formé sur le ferment nitreux, les chiffres obtenus pour le nitrate ne peuvent correspondre exactement aux doses de nitrite ajoutées, car nous n'avons pas tenu compte de la concentration et des légers changements de volume dus à l'addition des doses successives de nitrite, notre but étant simplement de déterminer la proportion de nitrate nuisible au ferment nitrique. Nous voyons que cette proportion est de 25 grammes par litre environ.

Il est curieux de constater qu'à l'inverse des autres espèces microbiennes, le ferment nitrique est plus gêné par la concentration du produit auquel il s'attaque (nitrite) que par la concentration du produit qu'il forme (nitrate). En effet, le nitrite à la dose de 10 grammes par litre arrête la marche du ferment, même soumis à l'accoutumance, tandis que le nitrate formé ne l'arrête qu'à la dose de 25 grammes par litre.

Influence de l'addition de divers nitrates. — Nous avons voulu voir si l'addition de doses variables de nitrates dans le milieu avant l'ensemensement du ferment nitrique produit une action nocive analogue à celle du nitrite de soude sur le nitreux. 20 c. c. de milieu minéral à 1 gramme par litre de nitrite de

soude ont reçu des doses croissantes de 1 à 100 grammes par litre de divers nitrates (potasse, soude, chaux, magnésie). On a ensemencé les deux ferments Bruyère et Lit bactérien, et noté la durée de la nitrification. Voici les résultats obtenus :

DURÉE DE LA NITRIFICATION :

Doses de nitrates en gr. p. litre.	Nitrate de soude.		Nitrate de potasse.		Nitrate de chaux.		Nitrate de magnésie	
	Bruyère.	Lit. bact.	Bruyère.	Lit. bact.	Bruyère.	Lit bact.	Bruyère.	Lit bact.
1	7 jours.	8 jours.	7 jours.	8 jours.	7 jours.	7 jours.	7 jours.	7 jours.
2	7 —	8 —	7 —	8 —	7 —	7 —	7 —	7 —
4	7 —	8 —	7 —	8 —	7 —	7 —	7 —	7 —
8	7 —	8 —	7 —	8 —	7 —	7 —	7 —	7 —
10	8 —	11 —	7 —	8 —	10 —	7 —	7 —	7 —
20	2 mois.	2 mois.	13 —	13 —	incompl.	incompl.	12 —	12 —
100	incompl.	incompl.	incompl.	incompl.	—	—	incompl.	incompl.

Témoins sans addition de nitrates : durée de la nitrification { Bruyère..... 7 jours. Lit bactérien. 7 —

Nous constatons que le phénomène observé avec les nitrites de soude et de potasse sur les ferments nitreux ne se produit pas ici. Le nitrate de soude ne commence à être nuisible qu'au delà de 10 grammes par litre environ. Cependant, les milieux qui contiennent 20 grammes par litre de ce sel ont nitrifié complètement au bout de deux mois. Le nitrate de potasse gêne moins; la nitrification est à peine retardée de quelques jours par une dose de 20 grammes par litre. Le nitrate de chaux est beaucoup plus nuisible; au delà de 10 grammes par litre, la formation de nitrates s'arrête. Le nitrate de magnésie n'a aucune action tant que la concentration ne dépasse pas 20 gr. par litre.

Des expériences complémentaires nous ont montré que le nitrate de soude gêne le développement du ferment nitrique à la dose de 20 gr. par litre, les nitrates de potasse et de magnésie à la dose de 25 gr., le nitrate de chaux à la dose de 12 grammes.

CONCLUSIONS

En résumé, nous arrivons aux conclusions suivantes :

1° Les ferments nitreux sont tués par un chauffage de 5 minutes à 45°, les ferments nitriques par un chauffage de même durée à 55° ;

2° La température optimum de culture pour les ferments nitreux et nitriques est de 37° ;

3° La marche de la nitrification est considérablement accélérée par la culture des ferments nitrificateurs sur scories, surtout quand celles-ci sont placées dans de petits tonneaux auxquels on fait subir de temps à autre une révolution ;

4° La production de nitrites est arrêtée quand on cultive les ferments nitreux dans des liquides contenant 30 à 50 grammes par litre de sulfate d'ammoniaque ;

5° La marche du ferment nitreux se trouve ralentie quand il a produit 8 à 10 grammes de nitrite de magnésie par litre; quand cette proportion atteint 13 à 15 grammes, la nitrification s'arrête ;

6° La présence de nitrites de potasse ou de soude dans les milieux où on ensemence le ferment nitreux gêne considérablement la multiplication de ce ferment, et allonge la durée de la nitrification. Les nitrites de chaux et de magnésie produisent une action analogue, mais beaucoup moins accusée ;

7° La présence de nitrates de soude ou de potasse dans les milieux où on a ensemencé le ferment nitreux gêne même à des doses faibles (1 à 5 grammes par litre) le développement de ce ferment. Les nitrates de chaux et de magnésie ne gênent qu'aux concentrations fortes (1 0/0 au moins).

8° La transformation des nitrites en nitrates par le ferment nitrique devient d'autant plus difficile que la concentration du milieu en nitrite est plus forte. Quand la proportion de nitrite atteint 20 grammes par litre, il n'y a plus de nitratation ;

9° La marche du ferment nitrique est arrêtée par le nitrate de soude produit, quand sa proportion atteint environ 25 grammes par litre ;

10° La présence de nitrates de potasse, de soude ou de magnésie dans les liquides où on ensemence le ferment nitrique ne gêne pas son développement tant que la proportion de ces sels n'atteint pas 20 ou 25 grammes par litre. Le nitrate de chaux ralentit la nitratation à la dose de 12 grammes par litre.

Nous continuons actuellement ces recherches par l'étude de la nitrification des divers sels ammoniacaux et des divers nitrites. Ce sera l'objet d'un prochain mémoire.

Sur l'existence de l'arsenic dans l'œuf des oiseaux.

Par M. GABRIEL BERTRAND

A la suite de mes recherches sur l'arsenic normal de l'organisme [1], j'ai cru logique d'admettre que ce métalloïde est, ainsi que le carbone, le soufre et le phosphore, un élément constant de la cellule vivante, qu'au lieu d'être localisé dans quelques organes, comme pensait l'avoir établi M. Armand Gautier [2], il existe au contraire, dans tous les tissus. Si cette conclusion est exacte, si, bien mieux, l'arsenic est un élément physiologique, c'est-à-dire nécessaire à l'existence, il doit y en avoir dans l'organisme à toutes les périodes de la vie, dans les cellules embryonnaires comme chez l'adulte. On doit, dès lors en rencontrer dans l'œuf des oiseaux, là où l'embryon est obligé d'accomplir tout son développement sans pouvoir tirer du milieu extérieur la plus petite partie de l'arsenic dont il a besoin. Cette manière de voir m'a conduit à rechercher l'arsenic tout d'abord dans l'œuf de la poule, et je puis donner aujourd'hui les résultats positifs auxquels je suis parvenu.

J'ai fait trois séries d'expériences : la première, en quelque sorte préliminaire, sur des œufs trouvés dans le commerce et dont l'origine était, par suite, indécise ; les deux autres, au contraire, sur des œufs de poules élevées à Paris, dans un espace clos, et nourries, depuis la génération précédente, avec des grains de froment, de sarrasin et des débris de légumes.

Dans chaque série d'expériences, on séparait les œufs, lavés extérieurement, en quatre parties : les coquilles, les membranes coquillières, les blancs et les jaunes. Dans une portion aliquote de chacune de ces parties, on dosait la matière sèche, par dessiccation à + 110° ; dans une seconde, on opérait la recherche et le dosage de l'arsenic, suivant la méthode que j'ai déjà eu l'occasion de décrire [3].

Les réactifs utilisés étaient extrêmement purs, puisqu'on n'a

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XVI, p. 553-561 (1902) et t. XVI, p. 1-10 (1903).

2. Voir *Comptes rendus. Acad. des Sciences*, t. CXXXV, p. 812 (1903).

3. *Ann. de l'Inst. Pasteur*, t. XVII, p. 1-10 (1903) et mieux encore : *Ann. de Chim. et de Phys.* 7e série, t. XXVIII, p. 242-275 (1903).

pu déceler trace du métalloïde dans 300 grammes d'acide nitrique évaporés, par portions, en présence de 20 grammes d'acide sulfurique [1].

Comme, d'autre part, on prenait seulement 5 à 30 grammes d'acide nitrique et 2 à 8 grammes d'acide sulfurique [2] dans chaque attaque (correspondant à deux ou trois œufs), on voit que l'arsenic trouvé n'a pas dû être introduit par les réactifs.

Suivant une observation que j'ai faite autre part [3], on ne peut obtenir tout l'arsenic de la matière organique dans une seule attaque, à moins d'employer une assez forte quantité de réactifs. Au point de vue de la certitude qualitative, — et, pour le moment, c'est le principal auquel je me place, — il est préférable d'opérer par attaques successives, en prenant chaque fois une dose limitée d'acides.

Après la première attaque, le résidu ulmique insoluble resté sur le filtre, et dans lequel une partie du métalloïde cherché est quelquefois retenue avec force, est soumis à l'action d'une nouvelle quantité de réactifs, égale à la première ; il diminue à peine de poids, peut retenir encore une proportion sensible d'arsenic, et souvent, doit être attaqué une troisième et même une quatrième fois. La séparation de l'arsenic devient alors assez longue ; par compensation, elle présente, touchant l'origine du métalloïde, un degré de certitude qu'on ne saurait atteindre autrement.

Si, en effet, l'arsenic provient seulement des réactifs, on doit en trouver une quantité constante après chacune des attaques, toutes les conditions (poids d'acides, nature du résidu, etc.) restant à peu près invariables. Si, au contraire, l'arsenic est fourni par la matière organique, on a des chances, étant donnée l'action énergique des réactifs, d'en obtenir des quantités rapidement décroissantes, le résidu insoluble n'étant bientôt plus formé que de matières ulmiques tout à fait débarrassées du métalloïde.

Comme il est facile de l'imaginer, on ne peut s'attendre à

1. Les procédés de purification des réactifs sont décrits dans le mémoire des *Ann. de Phys. et de Chim.*

2. Sauf avec les coquilles, à cause de la nécessité de transformer toute la chaux en sulfate.

3. *Loc. cit.*

une très grande approximation, lorsqu'il s'agit d'évaluer des quantités aussi petites que des millièmes de milligramme; néanmoins, on reconnaîtra très bien, dans les tableaux qui suivent, l'allure nettement décroissante du poids d'arsenic obtenu dans les attaques successives d'une même partie de l'œuf de poule. Le phénomène est surtout évident dans le cas des coquilles, où, d'après quelques essais particuliers, l'arsenic semble contenu sous la forme d'arséniate de calcium. Il est peu sensible, par contre, dans le cas des jaunes, parce que la richesse de cette partie de l'œuf en matières grasses rend les attaques à la fois difficiles et irrégulières.

PREMIÈRE SÉRIE D'EXPÉRIENCES

Sur le mélange de dix œufs, de petite taille, achetés à Paris :

Poids total des jaunes........	158	grammes.	Matière riche.	49,2 0/0
— — blancs.........	242	—	—	12,5 0/0
— — membr. coquill.	10	—	—	40,0 0/0
— — coquilles.......	46	—	—	93,8 0/0

On a recherché l'arsenic, d'une part, sur des quantités de jaune et de blanc correspondant à trois œufs; d'autre part, sur la totalité des membranes coquillères et des coquilles.

Quantités employées.

Jaunes........	47 gr.	(soit 23 gr. de mat. sèch.)	+ 23 gr. de mél. acide	+ 5 gr. SO^4H^2
Blancs........	72 —	(— 9 — —)	+ 12 — —	+ 5 — —
Membr. coquill.		(— 4 — —)	+ 5 — —	+ 2 — —
Coquilles......		(— 44 — —)	+ 110 — —	+ 96 — —

Arsenic obtenu en millièmes de milligramme.

Jaunes.......	1re attaque...............	2,0	
....	2e —	1,5	
....	3e —	2,0	
Blancs........	1re —	0,5	
....	2e —	0,0	(trace très faible).
Pellicules....	1re —	2,0	
Coquilles.....	1re —	3,5	
.....	2e —	0,5	

DEUXIÈME SÉRIE D'EXPÉRIENCES

Sur trois œufs d'origine connue, provenant de poules élevées à Paris dans les conditions indiquées plus haut (ponte d'hiver).

Les attaques ont porté seulement sur deux œufs, un tiers servant au dosage de la matière sèche.

Dans cette série d'expériences, on a pris, pour toutes les attaques des quantités égales de réactifs, soit 33 grammes du mélange acide et 5 grammes d'acide sulfurique, excepté toutefois pour la première attaque des coquilles, pour laquelle on a ajouté en plus 8 grammes d'acide sulfurique.

Poids des jaunes	51 grammes.	Matière sèche.	49,1 0/0
— blancs	89 —	—	11,6 0/0
— membr. coquill.	1gr,57	—	22,8 0/0
— coquilles	12 grammes.	—	95,7 0/0

Arsenic obtenu en millièmes de milligramme.

Jaunes	1re attaque	0,5
	2e —	1,5
Blancs	1re —	0,5
	2e —	1,0
Membr. coquill	1re —	1,0
Coquilles	1re —	2,0
—	2e —	0,5

TROISIÈME SÉRIE D'EXPÉRIENCES

Sur trois œufs des mêmes poules que dans la seconde série (ponte de printemps), en se servant des mêmes quantités de réactifs. Les attaques ont eu lieu aussi sur deux œufs.

Poids des jaunes	51,6	Matière sèche	50,52 0/0
— blancs	104,2	—	12,48 0/0
— membr. coquill	1,6	—	25,00 0/0
— coquilles	14,7	—	93,88 0/0

Arsenic obtenu en millièmes de milligramme.

Jaunes	1re attaque	2,0
	2e —	1,5
	3e —	3,0
Blancs	1re —	2,0
	2e —	1,5
Membr. coquill	1re —	5,0
Coquilles	1re —	3,0
—	2e —	0,5

De l'ensemble de toutes ces expériences on peut conclure que toutes les parties de l'œuf de poule contiennent des quantités appréciables d'arsenic; toutefois, c'est le jaune qui, de beaucoup, est le plus riche : sur 1/200 de milligramme trouvé, en moyenne, dans un seul œuf, depuis la moitié jusqu'aux deux tiers appartiennent au jaune.

Le blanc est au contraire le plus pauvre.

Enfin, malgré son faible poids, la membrane coquillière renferme à peu près autant et quelquefois plus d'arsenic que le blanc. C'est-à-dire que cette substance, de nature kératinique, est relativement très riche en métalloïde. Avec certains œufs, il m'a suffi d'attaquer $0^{gr},15$ de membrane coquillière sèche, correspondant à un seul œuf, pour obtenir un bel anneau arsenical.

J'ai répété ces expériences sur l'œuf de l'oie et sur l'œuf de la cane.

Comme on peut en juger par les tablaux ci-dessous, le mode de répartition de l'arsenic dans ces œufs est le même que dans l'œuf de la poule. Seule, la richesse en métalloïde varie notablement. Un œuf d'oie, pesant 150 grammes, ne contient pas plus d'arsenic qu'un œuf de poule, soit 1/200 de milligramme; l'œuf de la cane est beaucoup plus pauvre; avec un poids moyen de 75 grammes, il ne fournit que 1/500 de milligramme du métalloïde.

Arsenic de l'œuf d'oie, en millièmes de milligramme.

On a opéré sur un seul œuf.

Jaune	(poids frais 57 grammes.)	1re attaque	0,0
—	(— — —)	2e —	0,5
Blanc	(— 72 —)	1re —	1,0
—	(— — —)	2e —	0,5
Coquille	(— 21 —)		1,0

Arsenic de l'œuf de cane, en millièmes de milligramme.

On a opéré sur deux œufs.

Jaunes	(poids frais 66 grammes.)	1re attaque	1,5
—	(— — —)	2e —	0,5
Blancs	(— 66 —)	1re —	1,0
—	(— — —)	2e —	0,5
Coquilles	(— 14 —)		0,5

Tous ces résultats, différents de ceux qui ont été publiés antérieurement [1], n'ont pu être obtenus qu'en raison de l'extraordinaire sensibilité de ma méthode de recherche. Ils confirment l'existence et le rôle probable de l'arsenic dans toutes les cellules vivantes, et autorisent à tirer, en toute certitude, les conséquences qui découlent de cette importante observation.

1. *Comptes rendus Ac. Sc.*, t. III, p. 289 (1900).

Le Gérant : G. Masson.

Sceaux. — Imprimerie Charaire.



Edmond NOCARD

IVES, PARIS

17me ANNÉE AOUT 1903 No 8

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

EDMOND NOCARD

L'Institut Pasteur vient de faire encore une grande perte. Ed. Nocard est mort. Pour les lecteurs des *Annales*, ce nom rappelle toute une longue série de travaux marquant dans la science. Pour ceux qui connaissaient l'homme et l'ont vu à l'œuvre, ils ont une sensation plus pénétrante, c'est que voilà une force éteinte sur laquelle ils comptaient, et avec tant d'espérances! Combien de fois, en face de quelque point délicat de leurs recherches, n'auront-ils pas à se dire : Ah! si Nocard était encore là.

C'est qu'il avait le don d'éclairer et d'animer tout ce qu'il touchait. Il mettait un peu de sa vie forte dans chacune de ses œuvres. On le vit bien dès qu'il entra, conduit par son ami E. Roux, dans le laboratoire de Pasteur, où il apportait la seule chose qui y manquât alors, la vétérinaire. Ce beau garçon, tout jeune, ne se contentait pas d'avoir appris : il savait, de cette science rare qui ne demande qu'à se renouveler, et pour laquelle le mouvement est un besoin. C'est l'éloge de l'enseignement vétérinaire d'avoir toujours compté et créé des esprits pareils, par la vertu toute-puissante de ce qu'il contient d'expérimental.

A l'Institut Pasteur, Nocard se trouvait dans son élément. Il y était heureux. Les idées n'y restaient pas en chômage. Avec sa promptitude et sa finesse à comprendre, avec son habileté comme technicien, il était un collaborateur précieux. Il était quelque chose de plus, il était

un conseiller, et cela par une qualité précieuse, son bon sens aigu et dominateur. On croira peut-être que je lui mesure l'éloge, en mettant en avant chez lui cette faculté. Je n'en connais pas de plus exceptionnelle. Savoir conserver son sang-froid de chercheur au milieu des faits révolutionnaires qui vous assaillent, rester quasi d'instinct sur la véritable voie, qui n'est peut-être pas toujours la plus courte, mais la plus sûre, y tenir en complet équilibre toutes ses facultés, de façon à profiter des bonnes chances et à pallier les mauvaises, donner ainsi l'impression d'un esprit sûr et maître de lui, c'est être de premier ordre, parce qu'on répand ainsi autour de soi la foi. Pasteur a bénéficié d'avoir rencontré Nocard, comme Nocard de l'avoir connu.

Ce sont les mêmes qualités que nous avons vu briller jusqu'à la fin chez notre ami, mort à la fleur de son talent. Elles se résument pour nous dans cette réalité charmante de Nocard prenant la parole pour une discussion entre égaux, dans un congrès scientifique ou dans une des nombreuses Commissions dont il faisait partie. Ne parlant que lorsqu'il avait quelque chose à dire, le faisant alors avec un air de bonne humeur d'accord avec la courtoisie constante du geste et du discours, c'était à peine si son œil malicieux indiquait de temps en temps une critique, car il discutait surtout avec des faits. Mais ceux-là, il y en avait toujours tant, et ils s'arrangeaient spontanément en si bel ordre qu'il donnait toujours l'impression d'avoir raison. Si bien qu'il profitait de la marche donnée à la discussion pour s'effacer, et lorsqu'on lui faisait compliment du résultat : « Les faits parlaient si haut, » disait-il modestement. Ils parlaient bien quand c'était par sa bouche.

Et voilà pourquoi nous nous disions si souvent, à l'Institut Pasteur, que Nocard était irremplaçable.

ÉTUDES D'HYDROGRAPHIE SOUTERRAINE

PAR E. DUCLAUX

PRÉLIMINAIRES

L'hygiène des eaux potables a perdu, dans ces dernières années, un peu de sa primitive intransigeance. Quand Pasteur et Joubert eurent découvert qu'il y avait des sources sans germes microbiens, on pensa tout naturellement qu'il ne fallait en avoir que de pareilles, et on ne recula que devant l'impossibilité d'en trouver. Aujourd'hui, la source *pure* n'est plus qu'un idéal dont on cherche à se rapprocher; on admet qu'une eau peut être bonne, et pourtant contenir des germes : il suffit qu'elle n'en contienne pas de dangereux, et la liste de ces derniers n'est pas longue, attendu qu'elle se réduit en ce moment au bacille typhique. Comme ce bacille ne provient jamais que de l'intestin d'un typhique, et qu'à moins d'épidémie, les typhiques ne sont jamais nombreux, on peut se proposer de les empêcher d'infecter les eaux potables par leurs déjections, et j'ai proposé à la Ville de Paris, qui a un très large réseau de sources, un système de surveillance qu'elle a très bien organisé, et qui assure assez bien ce résultat, depuis deux ans qu'il fonctionne. Le service de la prophylaxie n'est donc pas désarmé, et toute ville qui a ou aura quelque inquiétude au sujet de son système artériel d'eaux potables pourra vivre dans une sécurité relative, si elle établit une surveillance des typhoïques sur toute la surface qui alimente ses sources.

Mais quelle est cette surface? Où tombent ces eaux, qui, arrivées au sol à peu près pures, s'y chargent de germes banaux ou dangereux, dont elles ne se débarrassent ensuite qu'au prix d'une filtration qu'elles ne subissent pas toujours au degré qu'il faudrait? Quand elles sortent du sol, sous forme de sources, fortes ou faibles, ces eaux sont devenues limpides, d'ordinaire. Mais la limpidité ne traduit pas la pureté. Elles sortent fraîches quand

elles ont pris la température du sol qu'elles ont traversé. Mais la fraîcheur est une protection bien faible. L'erreur de Belgrand, auteur du très remarquable système d'adduction des eaux de la Ville de Paris, a été de croire que ces deux caractères suffisaient. Il a manqué à Belgrand de connaître les microbes, et de croire en eux. Ils ont ouvert devant les ingénieurs une série de problèmes, et, depuis lors, on a dû se préoccuper, non pas de la partie artérielle de la canalisation, faite de main de maître, mais de sa partie veineuse. Comment se forment, à l'intérieur du sol, ces sources qu'on a captées et envoyées à Paris? Quelles sont les surfaces et les épaisseurs de terrains qu'elles ont lavées avant de redevenir visibles et saisissables? Et, pour tout dire en un mot, quelle est l'hydrographie souterraine de la région où s'alimentent nos sources. Il existe une hydrographie extérieure, qui nous dit où vont les sources, les rivières et les fleuves. Mais existe-t-il une délimitation de courants correspondante au moment où le trajet de l'eau est invisible, entre la surface du sol sur laquelle tombe uniformément la pluie, et la source qui, par essence, est rare? Voilà la question. Rien que la façon de la poser indique bien qu'elle n'est pas résolue. Mais nous sommes avisés aussi qu'elle est très urgente à bien résoudre.

Les premières études faites par la Ville de Paris, du côté veineux de la question, lui ont apporté certaines surprises. Elle n'avait aucune idée du champ immense que couvrait sa *région des sources*, et qui est devenu celui sur lequel il faut étendre la surveillance médicale dont j'ai parlé plus haut. De ce côté la ville n'a pas eu de chance : elle pouvait mieux tomber. Mais elle est riche et se tirera d'affaire. Quand les recherches auront abouti, la solution s'appliquera à beaucoup d'autres pays, de même constitution géologique. Mais il n'est pas douteux qu'elles ne seront pas générales. Il faudra les recommencer quand on rencontrera d'autres conditions, car chaque pays a son hydrographie souterraine, et un pays de granit ne s'organise pas, sous ce point de vue, comme un terrain calcaire.

C'est pour cela que j'ai commencé en 1894, avant que la question fût ouverte pour Paris, une série d'études de cet ordre portant sur un département, celui du Cantal, où j'avais organisé pour cela l'emploi de mes vacances. Le Cantal est un pays volcanique d'une construction très simple, quand on se borne aux

traits principaux. Il me paraissait et s'est montré du reste fait pour cette ordre d'études. J'y ai installé, à frais communs avec le Ministère de l'Agriculture, un petit laboratoire, qui n'a plus d'existence officielle depuis 2 ans. C'est ce qui a été fait dans ce laboratoire que je voudrais dire brièvement : c'est un commencement de l'histoire d'un pays au point de vue de sa circulation souterraine. Nous verrons que c'est aussi l'histoire de son développement et de sa vie.

I. Topographie.

Le Cantal est une roue sans jantes, placée au milieu d'une assiette à soupe. Du moyeu, placé au centre, partent dans toutes les directions des coulées montagneuses qui se transforment en collines à mesure qu'elles s'étendent dans la plaine, et entre lesquelles une quinzaine de vallées rayonnantes envoient leurs eaux vers tous les points de l'horizon. Les rivières, assez rectilignes tant qu'elles ont pour guides les rayons de la roue, rencontrent ensuite les escarpements des bords de l'assiette, et ne les franchissent qu'au prix d'efforts qui les tordent et les dévient. Elles ont été obligées de se creuser, pour sortir, des gorges tourmentées et profondes, avant de se jeter dans des fleuves plus vieux : la Dordogne, le Lot, l'Allier, qui leur rendent leur cours régulier. Le département du Cantal contient toute leur histoire volcanique.

Cette histoire est celle de l'implantation d'un pâté montagneux sur une vaste surface faite surtout de schistes cristallins, gneiss, micaschistes, traversés par des épanchements de granites et de porphyres. Au milieu de l'assiette, les mers oligocènes et miocènes remplissaient déjà une vaste dépression où elles déposaient du calcaire. Ce sont les couches les plus profondes du sol du Cantal qui soient datées. On les trouve en abondance dans le bassin d'Aurillac, et, par places, mais probablement déplacées par soulèvement, dans les autres arrondissements, de sorte qu'on a le droit de se les représenter comme formant le socle du massif volcanique qui s'est édifié peu à peu sur elles.

Les premières éruptions du Cantal ont été, Rames l'a montré, des basaltes miocènes. Ce savant a découvert en 1873, au puy Courny, près d'Aurillac, des couches de ce basalte pla-

cées entre deux formations sédimentaires classées, par leurs fossiles, comme étant des calcaires oligocènes et des sables miocènes. Le niveau du socle sur ce point est aujourd'hui de 650 mètres environ. Comme le Plomb du Cantal s'élève à 1,850 mètres environ, c'est de 1,200 mètres que le plus haut piton volcanique d'aujourd'hui domine sa base, et comme sûrement ce massif a été découronné, et dominerait, s'il était intact, de 3 ou 400 mètres au moins sa hauteur actuelle, on voit la puissance de la couche qui s'est étalée sur ces couches de début du puy Courny.

C'est ici que l'intérêt commence pour nous, témoins de l'existence d'un volcan mort et héritiers de la façon dont il s'est produit. Cette façon est celle de tous les volcans: un cratère autour duquel s'accumulent les déjections, et dont la hauteur augmente. De la bouche d'éjection sortent des cendres, des pierres, des scories pâteuses et se solidifiant en route, de véritables coulées de laves qui parcourent plusieurs kilomètres en suivant les lignes de plus grande pente telles que les offre à ce moment le volcan en voie d'édification, et tout cela se groupe, s'étage, en conservant à l'ensemble une forme conique. Dans le Cantal, tout a fini par une ou plusieurs coulées de basalte, revêtant le volcan d'une sorte de manteau. Puis, quand le volcan faiblit ou s'éteint, c'est la période de destruction qui commence de suite. La construction a été trop brutale pour être solide. Les agents atmosphériques, et de préférence les eaux, se mettent à l'œuvre. Ce sont des agents égalitaires, et il suffit de leur ratissage permanent pour produire les plus grands effets mécaniques.

Le Cantal est un volcan en voie de dégradation. L'ancien cratère est entraîné par l'eau ou éboulé sur les pentes. A sa place et à celle des matériaux égueulés par les dernières convulsions, nous avons en ce moment un débris de cratère formé d'une enceinte en entonnoir, d'environ 8 kilomètres de diamètre, avec le Plomb du Cantal et le puy Mary comme extrémités diamétrales, et le puy de Griou comme point central. L'enceinte est encore complète, sauf sur deux points où elle a été forcée et détruite par l'action des eaux qui, tombées dans cet entonnoir de 50 ou 60 kilomètres carrés de surface, *voulaient sortir*, et l'ont fait par les vallées de ce qui est aujourd'hui la Cère et la Jordanne. Voilà pour le moyeu central de notre roue. Quant

aux vallées courant entre les rais, on devine ce qu'elles pouvaient être, en ces temps reculés, avec un massif plus élevé et plus puissant que maintenant, car le volcan du Cantal formait groupe avec les volcans voisins de la Haute-Loire et du Puy-de-Dôme. C'étaient de véritables fleuves-torrents qui les remplissaient.

La dégradation semble avoir au moins progressé très vite. Le sol a été le plus attaqué, naturellement, sur les surfaces qui se défendaient le moins. Celles qui étaient les mieux protégées étaient celles que recouvraient les grandes nappes basaltiques venues des sommets. Ces coulées étaient homogènes et résistantes. De plus, au moment où le volcan s'est éteint, elles étaient dans des plaines de la surface d'alors, qu'elles avaient remplies de leurs masses fluides, ou bien dans des ravines, ou dans des dépressions où coulait souvent un petit cours d'eau. Ce sont ces fonds qui ont été préservés contre les érosions plus que ne l'ont été les hauteurs voisines. Celles-ci sont alors devenues à leur tour des fonds de vallées, corrodées par les pluies ou les phénomènes glaciaires, d'abord dans du terrain volcanique, puis dans le terrain calcaire sous-jacent, et c'est ainsi qu'on a pu retrouver sur les pentes du puy Courny les traces d'un contact et même d'un enchevêtrement entre deux couches, l'une de la mer, l'autre d'un volcan, et qui à ce moment étaient toutes deux en place. Les basaltes qui étaient autrefois dans des vallons sont aujourd'hui sur les montagnes. Les derniers sortis portent le nom de basalte des plateaux, et le relief du Cantal à l'époque actuelle est l'image négative du relief au moment où les derniers basaltes ont paru. Ce qui était vallée alors est aujourd'hui montagne, et les reliefs de l'ancien volcan sont occupés aujourd'hui par nos vallées.

En résumé, voici la situation actuelle : sur une grande partie du volcan, base de calcaire miocène. Sur cette base, et, là où elle n'existe pas, sur le terrain primaire lui-même, basaltes miocènes dont nous ne savons pas encore l'importance, attendu qu'on ne les voit que par tranches, aux limites du terrain volcanique, qui les a presque tout entiers recouverts; entre ces basaltes et les basaltes des plateaux qui recouvrent aujourd'hui les cimes, et qui forment une cuirasse protectrice pour les terrains qu'ils recouvrent, un énorme gâteau volcanique qui peut atteindre, au centre, 1,000 mètres ou 1,200 mètres d'épaisseur. Les basaltes,

si puissants qu'ils aient été pour façonner le relief actuel, et bien que leurs escarpements soient majestueux parfois, n'en sont pas moins, comme masse, un vernis sur une pomme. C'est la masse intermédiaire qui compte, et que nous avons surtout à étudier.

Il est bien entendu que cette masse n'est pas homogène. Diverses éruptions y ont accumulé et superposé leurs produits. Il y a eu souvent, entre deux éruptions successives, assez de temps pour que la terre ait pu se refroidir et se refaire une végétation, qu'une nouvelle éruption est venue brûler et ensevelir. Les différences d'un point à l'autre sautent aux yeux dès qu'on regarde; ainsi on distingue que tout est pénétré de filons de matières plus rares, phonolites, labradorites, qui à la diversité dans la nature viennent ajouter la diversité dans la structure, et amènent la plupart des accidents de terrain, de ce qu'on pourrait appeler les incidents de surface. Les géologues s'occupent en ce moment de débrouiller cet enchevêtrement : nous sommes obligés de les laisser à leur œuvre. Nous n'en sommes pas en effet arrivés au détail, en ce qui concerne les effets de cette structure générale sur les eaux. Nous admettrons, comme fait général, ce qui résulte de l'observation d'un certain nombre de faits particuliers, aussi grand que possible.

II

PÉNÉTRATION DE L'EAU

Voici donc l'eau de pluie tombant sur les plateaux et y rencontrant d'abord les nappes de basalte. C'est une roche compacte et qui ne s'imprègne pas; elle est naturellement débitée en colonnes hexagonales par des fentes perpendiculaires à la surface de refroidissement, et assez larges pour livrer passage aux pluies. Même lorsque la nappe basaltique n'est pas nue et qu'elle a laissé s'implanter une petite couche de terre, il n'y a pas de ruissellement. Mais l'eau qui a traversé rencontre bientôt le fond du vallon dans lequel le basalte a coulé autrefois. Elle y coule à son tour, parce que rien n'a changé pour elle dans les conditions d'autrefois. Il y a seulement une couche perméable de plus. Chaque coulée basaltique est donc une sorte de pont en long posé sur un ancien ruisseau, qui reparaît au point où la coulée cesse; c'est le fait si fréquent dans les basaltes des pla-

teaux du Puy-de-Dôme, où chaque coulée abrite un ruisseau, venant au bas de la coulée, à flanc de coteau par conséquent, former une ou plusieurs belles sources qui alimentent un village ou une ville. Clermont est dans ce cas pour les eaux de Royat. Les exemples sont plus rares et moins nets dans le Cantal, où les coulées sont plus anciennes et plus dégradées superficiellement. Mais nous y trouverons des sources de fin de coulée qui n'ont pas d'autre origine.

Prenons maintenant les eaux qui ont traversé ce premier obstacle et qui se sont infiltrées sous les basaltes, ou bien qui sont tombées directement sur les flancs et les éboulis du plateau. Elles tombent en prise dans cette masse puissante de déjections volcaniques dont j'ai dit plus haut que nous allions supposer l'homogénéité. Rien ne jure pourtant plus avec ce mot que l'aspect de la roche, formée de fragments compacts de diverse nature, empâtés dans une masse évidemment moins résistante, qui fait ciment. L'hétérogénéité est même telle qu'on se demande comment cette boue volcanique a pu être assez fluide pour couler aussi loin qu'elle l'a fait, car on compte de ces coulées qui ont plus de 20 kilomètres. L'étonnement augmente encore quand on songe que les roches qui entrent dans ce conglomérat ont l'air d'avoir été prises sur place par leur ciment, et entraînées comme les pierres des moraines glaciaires, avec cette différence que c'est le glacier tout entier et dans toute son épaisseur qui entraîne les blocs. Il y a toute une étude à faire de ce côté. Mais, pour le moment, nous nous trouvons en face d'un mortier à gros blocs. Eh bien, au point de vue de la pénétration de l'eau, c'est cette hétérogénéité qui leur donne l'homogénéité dont nous avons besoin, parce que ce mortier est partout pénétrable par l'eau. On le reconnaît sur toutes les surfaces mises à nu, surtout lorsque le vent, la pluie et la gelée peuvent entrer en jeu. Le mortier s'effrite, les blocs se mettent en relief, ne tombent que lorsque tout s'est délité autour d'eux. Et voilà comme s'alimente le courant de chute le long des pentes, constamment occupé à changer la physionomie du sol.

La végétation n'est pas un abri suffisant contre ces dégradations. Les agents atmosphériques mobilisent aussi les matériaux du ciment, y dissolvent et en emportent de faibles quantités d'éléments fertilisants, acide phosphorique, potasse, soude,

chaux, et laissent en place de l'argile. Ce qu'elles entraînent est pondéralement très peu par rapport à ce qu'elles prennent, et le massif est loin d'être aussi facile à attaquer qu'un massif calcaire. Il ne s'y creuse pas de canaux, ni même de rivières souterraines. Mais il n'en devient pas moins d'année en année plus comparable à une immense éponge, dans laquelle se fait un réservoir d'eau plus ou moins puissant, que les pluies et surtout les neiges de l'hiver alimentent, par en haut, pendant qu'il se vide plus bas par les sources. Le procès de pénétration et de la filtration se fait donc toujours de la même façon. Partout la paroi filtrante est insoluble, et ne cède à l'eau qu'une minime portion de sa substance. Nous avions donc raison de parler d'homogénéité. Mais elle ne va pas plus loin, et maintenant que nous avons établi une notion d'ensemble, nous pouvons y introduire la diversité qui nous donne l'accident.

L'accident ou l'incident est qu'il n'y a pas de ruissellement le long des pentes, comme dans un plateau qui serait formé d'un filtre homogène de 1,000 mètres d'épaisseur, se ressuyant en vertu des lois de la pesanteur. Il y a, réparties çà et là, des multitudes de sources. Lorsqu'on creuse en cherchant à en suivre une, on voit qu'elle se ramifie dans un sol ameubli, humide, avec des noyaux d'argile qui, n'ayant presque rien perdu de leur substance, sont restés à la place qu'ils occupaient dans le ciment, et la remplissent bien, même en foisonnant. En poussant un peu plus loin, on trouve des portions sèches, presque normales, mais où se revèlent des cassures dans la roche, des fentes dans lesquelles circule un mince filet. Bref, on voit qu'ici, comme en pays calcaire, mais avec des canaux plus étroits, une source est un confluent de sourcettes, glissant dans une région où la circulation de l'eau était pour une raison quelconque plus facile qu'ailleurs; *assise dans ces conditions, une source promet de vivre et travaille même à s'augmenter*. Leur stabilité dans le Cantal est en effet très remarquable. Nombreuses sont celles qui se sont visiblement enfoncées dans le sol, à force d'éliminer les matériaux qu'elles trouvaient au-dessus de leur orifice d'écoulement.

Ces orifices ne sont pourtant pas disséminés au hasard, et chacun a évidemment sa raison d'être. Pour les uns, les plus hauts, les plus voisins de la surface du plateau, on peut pour-

suivre sur le sol leurs lois de formation. Une dépression se dessine, par exemple, avec son tapis d'herbe et de terre végétale dans lequel il est tout à fait impossible de saisir un ruissellement. Toute la pluie et toute la neige de l'hiver sont bues. Cela fait, en acceptant le chiffre de 1^m,098, relevé par M. Ch. Puech, comme hauteur moyenne des pluies à Aurillac, plus de 10,000 mètres cubes par hectare, de quoi alimenter une source versant d'une façon continue environ un tiers de litre par seconde. On peut faire leur part à l'évaporation et à la pénétration dans un sol résistant ; on voit combien il faut peu de surface pour faire une source. Aussi ne faut-il pas s'étonner de trouver pour ainsi dire à chaque pas une source quand on se promène sur le Cantal, si haut qu'on monte. Cette abondance des eaux se manifeste du reste d'autre façon : on trouve des vacheries partout, et partout où il y a une vacherie, il y a une source.

Voilà pour celles qui proviennent de ressuiements de surface. Celles-ci s'alimentent et circulent à peu de profondeur. Le moindre accident de terrain, naturel ou provoqué, leur donne naissance, naturellement dans la partie déclive du terrain. Elles ne s'éteignent pas toutes en été, puisque c'est au moment de l'alpage des troupeaux qu'elles sont utiles. Leur température n'est jamais très haute, et elles sont habituellement, en été, au voisinage de 5 à 6°.

Quelquefois même, la source ne débite pas tout ce qui tombe, et on observe à toute hauteur des prés mouilleux ou même des tourbières, qui témoignent combien dans certains cas est insuffisante la pénétration de la masse volcanique.

Pour les eaux qui l'ont pénétrée, il est plus difficile de savoir ce qui les détermine à sortir. Il est clair que, si tout y était homogène, elles y couleraient perpendiculairement, ou à peu près. Mais les conditions de la nature sont toujours l'accident. Nous avons des couches superposées qui à l'origine ont coulé sur des moules coniques, c'est-à-dire ont une pente variable en chaque point comme grandeur et comme direction, qui ont été soulevées depuis leur dépôt, par des filons et des failles. Chaque accident est interprété à part par les pluies. Parmi ceux qui l'ont été le plus nettement, je citerai ceux qui sont dus aux longs intervalles écoulés entre deux éruptions, soit que le sol ait eu le temps de se couvrir d'un tapis de végétation, soit qu'il ait reçu sur une

coulée encore à vif, mais un peu refroidie, le nouveau courant de lave. La soudure n'a évidemment pas été intime et a laissé une couche de plus facile pénétration, par où se sont dirigées de préférence les sources. Il y a dans le Cantal des *lignes de sources* analogues à celles que Belgrand a signalées dans la vallée de la Seine, et produites à peu près par les mêmes raisons. Elles sont seulement dessinées non pas par une couche imperméable qui vient affleurer à fleur de coteau, mais par une ligne de plus facile circulation entre deux coulées successives.

Nous pouvons même prévoir la plus importante de ces lignes de contact. C'est à la surface de séparation des premières couches du sol volcanique et du calcaire miocène sur lequel elles ont coulé. Cette surface est souvent peu nette, elle est faite, dans les environs d'Aurillac, de sables quartzeux parfois très blancs et de couches de cailloux roulés de la grosseur du poing, sans trace d'éléments basaltiques. A ce même niveau, on trouve aussi, par places, des nappes de basalte miocène qui ont rempli les vallées, et continuent à y convoyer des eaux qui font naître des sources. Mais quels que soient les accidents intérieurs qui peuvent les commander, ces sources correspondent toujours à la surface de contact de deux terrains différents, un calcaire au bas, des terrains volcaniques au-dessus, et nous devons nous attendre à une abondante et copieuse ligne de sources au niveau du contact de la masse volcanique et de son socle.

Telle est cette série qui, tout le long de la vallée de la Cère, se développe à flanc de coteaux, depuis le pas de la Cère, qui marque à peu près sa limite nord, et qui passe par Salvagnac. Daisset, Comblat-le-Pont, Olmet, Aris, Marfons, Maruéjouls, en conservant à peu près son horizontalité, pendant qu'au-dessous d'elle la vallée se creuse. Il y a là, sur un parcours d'une dizaine de kilomètres, une quinzaine de très belles sources dont les eaux servent à l'irrigation des prairies, et donnent à la vallée son aspect verdoyant. Les bois qui couvrent jusqu'au sommet les portions non irrigables contribuent à assurer cet aspect, et pour le voyageur qui remonte la vallée en regardant par la portière, la structure du pays se traduit d'une façon très claire : il y a au sommet des contreforts une ligne qui dévale peu à peu en pente douce vers la plaine et qui n'a pas d'arbres parce qu'elle n'a pas

assez de sol et que ses bords sont taillés à pic. C'est la couche des basaltes pliocènes ou basaltes des plateaux. Au-dessous une ligne de forêts, correspondant à l'épaisseur totale des coulées de roches acides, poreuses, et réduites, en fait d'eau, à ce qui suffit aux forêts pour vivre, les pluies d'hiver. Sitôt qu'on arrive, ou à peu près, au niveau qu'atteint dans la vallée le socle volcanique dont nous avons parlé, le Cantal agricole reparaît, avec des prairies qui, limitées au départ, au voisinage de la rivière, ont l'air d'envahir peu à peu le coteau, parce que la nature et le travail de l'homme ont permis de retrouver et d'utiliser, à un niveau supérieur à celui de la plaine actuelle, les immenses quantités d'eau emmagasinées chaque année par les matériaux de l'ancien volcan.

Je dois dire qu'ici tous les géologues ne me suivent plus, et contestent l'idée de donner un socle commun au Cantal, c'est-à-dire à attribuer une telle importance à des couches qui n'apparaissent nettement que dans l'arrondissement d'Aurillac, et qui, déjà, dans l'arrondissement de Murat, sont à un niveau de 100 mètres plus élevé, ce qui, il faut le dire, n'est pas favorable à l'idée d'en faire des dépôts contemporains. Mais à Murat, on est au centre du volcan, et les dénivellations y sont très naturelles; de plus, on retrouve dans la vallée profonde de la Cère les calcaires oligocènes jusqu'à Thiézac. Il y en a, en place, sur la rive gauche, jusqu'à Vic, plus ou moins masqués par la végétation, par des éboulis, même par des alluvions quaternaires, qui remontent jusqu'au Pas de Cère. On les retrouvera ailleurs quand on voudra les chercher. Ce n'est pas du reste ici le lieu de discuter la question. Nous ne l'avons indiquée qu'en passant, pour marquer sa place dans l'idée générale que nous voulons nous faire du Cantal. Nous passons maintenant au détail de notre étude.

III

EAU DU LABORATOIRE D'OLMET

J'ai cité Olmet comme l'un des villages qui sont venus s'asseoir au bord d'une source sur le cordon qui limite, sur la carte géologique, les tufs et brèches andésitiques, et les alluvions quaternaires et récentes. Pour moi, c'est la trace à fleur de sol du plateau calcaire qui porte le volcan. Trois grandes sources

apparaissent à Olmet. La plus grande alimente le village Une autre arrose une grande propriété. La troisième dessert le laboratoire; j'ai pris celle-ci à sa sortie du sol et l'ai conduite part des tuyaux de fonte jusqu'à son orifice, à une distance d'environ 300 mètres. Elle circule donc pendant quelques minutes à une petite profondeur dans le sol. Le passage par une sorte de château d'eau la retient encore quelque temps, si bien qu'elle arrive au laboratoire à une température qui dépasse de 1° à 2° la température initiale; au regard de captation, cette température subit des fluctuations qui ne sont pas en accord avec les saisons, bien qu'elles en dépendent. C'est en hiver, en janvier ou février, que l'alimentation au départ se fait avec des eaux de neige, et à 0° par conséquent. Ces eaux se réchauffent en descendant et refroidissent en même temps le sol qu'elles traversent. On comprend qu'il s'établisse ainsi un certain équilibre mobile, variable d'un point à l'autre.

Les eaux parties de 0, sortent avec ce que tout le sol leur a donné de chaleur dans le trajet qu'elles y ont fait : c'est tantôt plus, tantôt moins. Ce sol en cède d'autant plus que les eaux qui l'empruntent sont plus abondantes. Mais comme la source de chaleur est limitée, le réchauffement n'est pas proportionnel à la quantité d'eau qui le sollicite. Toutes choses égales d'ailleurs, l'eau est donc moins chaude quand elle est abondante. Nous retrouverons cette question de température de l'eau quand nous lui demanderons sa valeur séméïologique; contentons-nous pour le moment de ne pas nous étonner de trouver à l'eau d'Olmet une température variable de 8°,1 à 11°. C'est en somme une très belle constance de température, qui en fait une délicieuse boisson d'été.

A raison de ses origines, M. Schlœsing père a désiré connaître sa richesse en nitrates. Il y a trouvé $2^{mgr},79$ d'acide azotique sur 5 litres, soit par litre 0,56 milligrammes. La matière azotée empruntée au moment du passage dans le sol a eu le temps de se nitrifier. A l'évaporation, le résidu de 1 litre est à peine coloré; cependant quand pour le dosage de l'acide nitrique on a réduit 5 litres de cette eau à quelques centimètres cubes, on obtient un précipité de silice coloré en jaune par de la matière humique. Le liquide résiduel filtré est également jaune. M. Schlœsing remarque qu'il retrouve la même coloration quand

il évapore les eaux de la Dhuis et surtout de l'Avre. L'eau de la Vanne n'en donne jamais.

M. Schlœsing a aussi fait de l'eau d'Olmet une analyse élémentaire que je suis heureux de posséder, parce qu'elle émane de lui d'abord, puis parce qu'elle donne des nombres que je n'ai pas jugé utile de rechercher à nouveau. Voici la fiche de ce savant :

Eau d'Olmet. 1 litre évaporé à sec : résidu.................... 75 mgr.
Après lavage à l'acide nitrique faible, le résidu, consistant en silice, devient... 41.8
Cette silice, calcinée au rouge.................................... 33.8

Dans le liquide acide, on dose :	Potasse..	5.1	24.0 mgr.
	Soude...	1.0	
	Chaux...	14.2	
	Magnésie.	3.7	

Il y a des traces d'acide sulfurique et de chlore.

La somme des corps dosés est donc :	Silice + hydrate.........	41.8
	Alcalis..................	24.0
	Total..................	65.8
A quoi il faudrait ajouter, pour les acides SO^3, HCl, AzO^5, env.		2
Ce qui ne laisse pour les corps non dosés (surtout CO^2) que : ...		75.0 } 7,2 m.
	moins....	67.8

Les bases dosées correspondent à une quantité de CO^2 beaucoup plus grande, mais il faut se rappeler que pendant l'évaporation la silice chasse la majeure partie de l'acide carbonique.

Pour le but que j'avais à atteindre, je n'avais pas besoin de recommencer des analyses aussi complètes. Il m'était intéressant de savoir que l'eau contenait, et en quelques proportions, de la potasse, de la soude et de la magnésie, empruntées à la roche qui devient de l'argile. Mais deux autres éléments avaient pour moi beaucoup plus d'importance.

La chaux est rare dans les pierres volcaniques, ou bien elle y existe sous des formes très résistantes; elle est rare aussi dans les eaux qui en découlent. Nous en avons trouvé 14 milligrammes par litre dans l'analyse de M. Schloesing. On est averti, par divers symptômes, qu'elle manque un peu à l'agriculture, et on voit bien qu'elle manque aussi aux habitants. Ceux qui ont à leur disposition une eau calcaire et une autre qui ne l'est pas, font très bien la différence. L'étude des quantités de chaux et celle de leurs variations prenait donc de l'importance. On pouvait dire d'une eau qui ne contenait que 10 à 20 milligrammes de chaux par litre qu'elle n'avait pas rencontré sur son chemin de massif calcarifère, et si cette eau était certainement, comme le sont celles du Cantal, de l'eau de profondeur venant d'une certaine distance dans le sol, on pouvait être sûr que dans ces fonds

insondables il n'y avait pas de calcaire. Si ce fait se reproduisait régulièrement un grand nombre de fois, dans les essais faits, sa signification générale n'apparaissait pas douteuse. Le fond du massif aquifère ressemblait à la surface. Si, au contraire, l'eau était calcaire, même lorsqu'elle venait sourdre au milieu d'éboulis et de détritus formés au détriment de sols volcaniques, on pouvait assurer qu'elle avait trouvé des couches oligocènes ou miocènes calcaires. Sa valeur séméiologique n'était pas douteuse, et elle prenait un niveau géologique.

La richesse en chlorures alcalins, évaluée en chlorure de sodium, avait un autre caractère, non moins intéressant. La pauvreté en sel des roches volcaniques est incroyable. Elles en ont pourtant contenu au moment de l'éruption ; du moins, à notre époque il n'y a pas de phénomène éruptif sans vapeurs et dépôts de sel marin. Mais les couches anciennes ont été lavées à fond, et les eaux qui les parcourent aujourd'hui n'en enlèvent que des traces de chlore. C'est ce qu'on voit partout. Quand on observe une augmentation insolite en sel marin, il faut ouvrir l'œil, et on s'aperçoit alors, d'ordinaire, que l'eau en question n'est pas hors de toute suspicion, qu'elle a reçu les écoulements d'un fumier, les imprégnations d'une étable, les fuites d'une fosse d'aisances, car il n'y a aucune raison qui amène le sel marin à remonter le long des pentes, autre que les besoins des hommes et des animaux. L'étude du sel marin présente donc, pour un pays comme celui-ci, une valeur hygiénique incontestable.

Je pourrais en dire autant d'un troisième élément, l'acide phosphorique. Il y a de l'apatite dans les basaltes, en quantité suffisante pour expliquer l'exportation sans retour qui se fait tous les ans de cet élément normal du lait, sous forme de fromages. La quantité qui passe par l'eau n'est pas grande. Dans une recherche faite sur 50 litres de l'eau d'Olmet, j'ai trouvé 4 dixièmes de milligrammes de PhO^5 par litre. Mais si l'eau a passé au contact des déjections humaines ou des fumiers, la quantité augmente et devient sensible dans 1 litre de liquide. On peut donc faire de ce côté un autre diagnostic qui ne double pas l'autre, et qui le complète. Je n'ai guère fait cette étude que lorsque la contamination dépassait la mesure, et elle a toujours réussi.

En résumé, je pouvais, pour cette recherche qui exigeait un grand nombre d'analyses d'eau, me borner à l'étude du résidu par litre, de la chaux, du chlorure de sodium. Bornée à cela, l'analyse devenait facile et courte.

L'acte le plus long, l'évaporation, qui s'est toujours faite au bain-marie, dans des capsules de platine de 50 c. c. environ, a porté sur des quantités d'eau toujours voisines de 1 litre. On pesait lorsque la capsule ne variait plus de poids. Les quantités de sel présentes étaient généralement trop faibles pour que sa présence fut gênante.

Redissous dans un peu d'eau, le dépôt était, dans la capsule même, traité par une solution normale de nitrate d'argent, après qu'on avait ajouté une goutte d'une solution étendue de chromate jaune de potassium. On dosait ainsi le sel marin.

On évaporait ensuite à nouveau, avec quelques gouttes d'une solution étendue d'acide nitrique, et quand on n'avait plus qu'un résidu sec, on le chauffait quelques instants au-dessous du rouge; on reprenait par l'eau, et dans le liquide filtré, on faisait un dosage de chaux par la méthode ordinaire, en la précipitant par l'oxalate d'ammoniaque. Je n'insiste pas, et je passe de suite aux diverses questions posées dans ce qui précède.

CONSTANCE DE COMPOSITION

La première question que nous avons à nous poser est de savoir quel fonds nous devons faire sur la composition de l'eau d'une source. S'il y a quelque part dans la nature un complexe pour lequel on soit autorisé à croire qu'il sera toujours le même, il est certain que c'est pour de l'eau traversant depuis un temps immémorial le même terrain sur une grande épaisseur. La pensée qu'il y a une certaine stabilité dans ce régime est générale. Partout on a fait des analyses, par unités, d'eaux de sources, de rivières, de fleuves, avec la pensée que la composition trouvée représentait toute autre chose qu'un état momentané, relatif au jour de la prise d'essai, et peut-être changé le lendemain. Voyons comment cette idée s'accorde avec les faits. J'ai fait, depuis 1894, 17 analyses de l'eau du laboratoire. Or, voici les résultats. Je les présenterai toujours de la même façon. Chaque échantillon a son numéro d'ordre, sa température au

moment de la prise à l'orifice dans la cour, les poids en milligrammes par litre du résidu, de la chaux et du chlorure de sodium. L'altitude est de 700 mètres environ.

Nos d'ordre.	Dates.	Tempre.	Résidu.	Chaux.	Sel marin.
1	4.VII.94	9,5	82	11	2,0
2	10.IV.95	8,1	71	11	2,0
3	6.VII.95	9,7	75	12	3,0
4	25.VII.95	10,0	86	11	2,0
5	9.VIII.95	10,2	84	8	2,0
6	24.IX.95	9,5	82	14	2,0
7	3.IV.96	—	76	11	2,0
8	21.IV.96	7,6	66	16	3,0
9	31.VIII.96	—	76	14	3,0
10	13.IX.96	10,1	83	8	2,0
11	27.XII.96	—	74	12	3,0
12	14.IX.97	9,9	90	14	2,5
13	3.X.97	—	74	17	3,0
14	6.IX.98	10,3	87	14	3,0
15	18.X.98	10,1	80	16	3,0
16	8.X.99	10,8	86	11	3,0
17	2.VII.03	11,0	86	9	2,0

Lorsqu'on envisage, dans leur ensemble et en les comparant, les chiffres de ce tableau, il est impossible de n'y pas voir que toutes ces eaux se ressemblent beaucoup; mais on voit non moins nettement qu'elles sont bien dissemblables pour des eaux d'une même source formées dans les mêmes conditions. Je n'insiste pas pour le moment sur leurs différences de température, sur lesquelles nous reviendrons, et qui sont, ici, influencées par des conditions d'aménagement. Mais les quantités de résidu sont variables; son poids à l'état sec augmente dans le régime d'été, diminue dans le régime d'hiver. Son maximum, 90, et son minimum, 66, sont entre eux comme 14 et 10. Pour la chaux, la quantité varie aussi, suivant un rythme qui n'est pas facile à apercevoir, mais avec des oscillations encore plus marquées; avec le maximum de 17 et le minimum de 8, la variation est du simple au double. Si, au lieu de s'opérer sur des poids de quelques milligrammes, elles se faisaient sur des poids de quelques décigrammes, comme cela arrive pour quelques eaux potables, il serait difficile de contester à un chimiste que ce sont des eaux différentes.

Je ne dis rien du sel marin, où la variation est minime et la constance grande. Je ne ferai observer en terminant que ceci : c'est que les trois substances étudiées ont chacune leur loi d'augmentation et de diminution suivant la saison. Les variations des chiffres sont discordantes, au lieu d'être concordantes comme on pourrait le croire actuellement, puisqu'elles sont formées dans les mêmes conditions.

En résumé, tout se passe comme si chacune des substances dissoutes avait sa loi de passage, et comme si l'eau que nous récoltons était formée de plusieurs autres, entrant en proportions différentes dans le mélange. Et du moment qu'on a été amené à cette idée, on en vient tout de suite à penser qu'il doit en être ainsi, parce que les chemins parcourus à l'intérieur du sol ne sont pas les mêmes. Il y a toujours des eaux de surface, même sur les pentes, et des eaux de profondeur, qui, naturellement, sont plus ou moins chargées ; naturellement aussi, ces eaux ne se mélangent pas en proportion constante. En été, par exemple, les pluies sont rares, et presque tout est de l'eau de fond ; en hiver, c'est l'inverse. Les variations de température ont les mêmes origines, qu'il faut combiner avec l'influence de la saison. Bref, on voit qu'alors même qu'on a fait ce qu'on a pu pour avoir une eau de source homogène, on n'arrive jamais à avoir autre chose qu'un mélange de plusieurs eaux, et que, dans la réalité, si l'homogénéité se fait, c'est à l'aide du mélange de quantités innombrables de filets non identiques.

C'est le même mécanisme qui permet de parler de l'homogénéité d'une nation.

(A suivre.)

Recherches sur la Fermentation du lait.

PAR MM.

HENRY TISSIER ET PASCAL GASCHING
ancien interne des Hopitaux. licencié-ès-Sciences naturelles.

(Travail du laboratoire du Professeur Metchnikoff)

L'un de nous a étudié, en collaboration avec M. Martelly, la putréfaction de la viande de boucherie[1], substance solide, composée en majeure partie de matières albuminoïdes et d'une quantité relativement faible d'hydrates de carbone, où le processus de destruction est tout entier commandé par des bactéries anaérobies protéolytiques. Nous devons maintenant étudier les mêmes phénomènes dans un milieu liquide comme le lait, où les matières protéiques sont en solution ou en suspension, où les substances hydrocarbonées sont en quantité beaucoup plus grande, et chercher si, dans ce milieu si différent, la destruction des divers éléments obéit aux mêmes lois générales.

Nous devons dire de suite que ces deux séries de travaux n'ont été entreprises qu'en vue de faciliter les recherches actuellement en cours sur la flore intestinale, et faire mieux comprendre son rôle physiologique et pathologique. Aussi, avons-nous laissé de côté les études chimiques un peu délicates, que nous n'avions, du reste, ni les moyens ni la compétence nécessaire pour entreprendre. Nous nous sommes bornés à déterminer les caractères morphologiques et les principales propriétés chimiques des espèces isolées.

Nous appellerons fermentation du lait la destruction complète de tous ses éléments, sucre, beurre, caséine; elle se rapproche de ce que nous avons appelé putréfaction de la viande, en ce que la dislocation de ses matières albuminoïdes s'accompagne du dédoublement de ses matières hydrocarbonées.

Il est peu de questions qui aient été aussi étudiées que celle des altérations spontanées du lait. Il en est peu qui soient pour le moment plus confuses. On a décrit, sans trop se préoccuper des doubles emplois, au moins 2 ou 300 espèces de microbes dont il faudra un jour faire le récolement, pour savoir ce que la

1. TISSIER et MARTELLY, ces *Annales*, t. XVI (1902).

science peut tirer de cet énorme amas de documents. Ce n'est pas trop de la vie d'une seule personne, et ce travail, surtout chimique, est pour le moment hors de portée. En attendant, nous avons pensé qu'il était utile de résumer ce qui peut en sortir comme idées générales, en nous plaçant au point de vue suivant : quels sont, en pratique, les microbes qui envahissent le lait le plus facilement et le plus communément, et dans quel ordre se produit la destruction de ses divers éléments, albuminoïdes, corps gras et sucrés, quand le lait *se gâte*, et entre dans la voie de décomposition totale, celle que Liebig avait appelée *Verwezung*.

Nous avons pris pour nos recherches tantôt du lait commercial acheté dans des crémeries de quartiers différents, tantôt du lait recueilli chez des nourrisseurs de Paris ou chez des fermiers de départements limitrophes. C'est ainsi que nous avons examiné des laits provenant de Cuts (Oise), de la ferme d'Arcy, des fournisseurs de l'Assistance publique, des asiles de la Seine, de laiteries ordinaires de Grenelle, de Vaugirard, du quartier des Invalides. D'autres ont été pris chez des nourrisseurs de Montrouge, de Grenelle, etc. Nous avons même eu à examiner du lait stérilisé coagulé artificiellement avec de la crème d'Isigny. Les uns avaient été recueillis l'été, en juin, août, septembre, les autres en automne, en hiver. Ils ont tous été conservés à la température du laboratoire, soit dans leurs flacons de vente dont le bouchon était remplacé par de l'ouate stérilisée, soit dans des ballons d'expérience. Ils étaient examinés aussitôt leur arrivée au laboratoire, puis tous les 8 ou 15 jours, pendant 8 à 10 mois, de façon à suivre toutes les modifications qui peuvent se produire. Dans certains cas même, des examens ont été quotidiens pendant les premiers mois.

Pour les isolements, nous nous sommes servis de la méthode de Veillon, qui est simple et commode, et qui nous a toujours donné de bons résultats. Nous avons simplement diminué la quantité de glucose dans la fabrication de la gélose. Nous nous servions de milieux contenant 10 0/00 de sucre au lieu de 15 qui est la quantité prescrite.

Nous avons de cette façon isolé environ 13 espèces qui sont pour la plupart connues. Nous ne donnerons une description détaillée que pour les bactéries que nous n'avons pu identifier.

DESCRIPTION DES MICRO-ORGANISMES

Entérocoque. (Escherich [1], Grotenfeld, Hirsch [2], Libmann [3], Thiercelin [4].) — C'est un saprophyte banal, qui a été décrit pour la première fois par Escherich en 1886. Un peu plus tard, Grotenfeld isole du lait une espèce très voisine, le *streptococcus acidi lactici*. En 1895, Tavel et Eguet, de Cerenville, trouvent dans certaines diarrhées un streptocoque dont la description se rapproche beaucoup de celle du *micrococcus ovalis* d'Escherich. C'est cette même espèce que Booker, Hirsch, Libmann décrivent dans certaines entérites et dans le lait qui avait servi à l'alimentation des nourrissons. En 1889, Thiercelin l'étudie dans les selles pathologiques et lui donne le nom d'*entérocoque*. L'un de nous [5], en étudiant la flore intestinale, normale et pathologique, des nourrissons, est amené à comparer les streptocoques d'Hirsch et Libmann avec l'entérocoque de Thiercelin; il montre qu'il est possible d'établir entre ces deux variétés quelques différences morphologiques. Depuis, il a pu voir que ces différences tiennent surtout à la provenance de l'échantillon examiné. Chez l'enfant nourri au biberon, cette espèce est plus vivace et possède des propriétés fermentatives plus grandes, tenant surtout au milieu plus favorable que chez l'enfant au sein, où les déchets nutritifs sont moins abondants. Le streptocoque intestinal et l'entérocoque sont donc deux espèces identiques.

Ses propriétés chimiques ont été bien étudiées par Coyon [6]. Rappelons qu'il n'attaque pas l'amidon, mais la dextrine, la lactose, le glucose et très faiblement la glycérine. Il donne, dans son attaque des sucres, de l'acide lactique que nous avons vu être de l'*acide inactif*, de l'acide acétique, formique et valérianique (2 d'acide acétique pour un d'acide valérianique). Il donne des traces d'alcool.

Les cultures s'arrêtent avec une acidité variant entre 2 et 2,45 0/00 en SO^4H^2.

Nous avons pu voir qu'il attaque plus rapidement et d'une façon plus complète le glucose que le lactose. Dans un milieu

1. Escherich, *Beitrage für Kenntniss der Darmbakterien*, Stuttgart, 1886.
2. Hirsch, *Centralbl. f. Bakt.* B. XXII, p. 369 (1897).
3. Libmann, *Centralbl. f. Bakt.* B. XXII, p. 376 (1897).
4. Thiercelin, *Soc. de biologie*, 15 avril 1899.
5. H. Tissier, Flore intestinale normale et pathologique des nourrissons. *Thèse de Paris*, 1900.
6. Coyon, Flore microbienne de l'estomac. *Thèse de Paris*, 1900.

contenant 15 0/00 de dextrose, on ne trouve plus après 8 jours de culture que des traces de sucre réducteur. On peut par contre retrouver dans le lait ensemencé, au bout du même laps de temps, de 38 à 40 0/00 de lactose.

Il n'agit pas sur les substances protéiques. Coyon signale cependant une faible action sur la caséine.

Il dédouble activement les protéoses en donnant des acides gras volatils et de l'ammoniaque.

Dans les milieux mixtes (peptonisés et sucrés), il agit simultanément sur les deux substances.

Cette espèce est très fréquente dans le lait où elle a été déjà rencontrée par de nombreux auteurs. Nous l'avons isolée 8 fois sur 10, surtout au début, avant la coagulation ou quelques jours après. Elle semble disparaître par la suite. Nous devons ajouter que c'est probablement ce streptocoque que W. Conn et W. Esten [1] ont retrouvé d'une façon constante dans le lait dans les 48 premières heures après la traite.

Staphylocoques. — Nous en avons isolé deux variétés : le *staphylococcus albus* et le *staph. citreus*. Elles semblent n'exister que rarement dans le lait. Nous ne les avons rencontrées qu'une fois et avant la coagulation.

La variété *staph. albus* avait les mêmes propriétés morphologiques et chimiques que celles de la race isolée dans la putréfaction de la viande. Son acidité d'arrêt était d'environ 1,47 0/00 en SO^4H^2. La variété *citreus* nous a paru bien moins active.

Rappelons seulement que ce sont des ferments mixtes, agissant à la fois sur les sucres et les substances protéiques, qui jouent un rôle important au début de l'altération du lait.

Bact. coli (variété commune). — Cette espèce, sans être aussi fréquente que le voulait Rowland, est cependant beaucoup moins rare que la précédente. Elle existe dans la moitié des cas environ et au début, dans les premières heures après la traite. Plus tard, il est difficile de l'isoler.

Nous savons que c'est un ferment actif des hydrates de carbone, sans action sur les albumines non hydratées. Dans les milieux mixtes, l'un de nous a vu avec M. Martelly que l'action fermentative ne se concentre pas sur la substance qui se trouve en plus grande quantité. L'*attaque est simultanée*. Quelle que soit

1. W. Conn et W. M. Esten, *Revue générale du lait*, 1902.

la quantité de sucre, il y a toujours action sur la peptone, et, quelle que soit la quantité de peptone, il y a toujours action sur le sucre. Il se produit simplement une déviation dans le type habituel de fermentation.

Bacillus fæcalis alcaligenes (Petruschky). — Nous avons également isolé une bactérie dont les principaux caractères se rapprochent de ceux du bacille de Petruschky [1]. On la trouve dans la plupart des laits altérés et à toutes les phases de la putréfaction. Elle est cependant plus abondante dans les périodes terminales, alors que le milieu est redevenu alcalin. C'est une espèce banale de l'intestin de l'homme et des animaux adultes.

Nous avons pu voir que son action sur les sucres est absolument nulle. Elle ne touche ni l'amidon, ni le lactose, ni le glucose. On retrouve intactes ces substances dans les milieux de culture, ce qui la distingue facilement du bacille typhique, qui est faiblement ferment du glucose.

Elle n'agit pas sur les albumines naturelles, mais dédouble activement les protéoses en donnant du carbonate d'ammoniaque et de l'ammoniaque.

Elle joue un rôle important dans la putréfaction du lait, grâce à sa faculté de vivre en milieu très alcalin. Elle complète la destruction de la caséine, lorsque celle-ci est peptonisée et transformée en substance visqueuse filante amère.

Bacillus acidi paralactici. — Kosaï identifie les bacilles de Weigmann, Leichmann, Gunter et Thierfelder, avec l'espèce qu'il trouve constamment dans le lait acide, et il la différencie du bacille de Hueppe, aérobie sporulé donnant d'abondantes cultures sur pomme de terre et sur gélose. Nons avons également trouvé dans toutes nos observations une bactérie répondant à la description.

Nous signalerons seulement sa résistance singulière à l'acidité des milieux. Il pousse en effet dans du lait coagulé spontanément et stérilisé, ayant une acidité de 2,45 p. 1,000 en SO^4H^2. Il attaque très vivement les sucres en donnant surtout de l'acide lactique droit. Ainsi, dans un milieu contenant 15 p. 1,000 de dextrose, il fait disparaître toute trace de sucre réducteur, et l'acidité totale = 3,43 p. 1,000 en SO^4H^2. Dans le lait, la culture ne s'arrête qu'avec une acidité égalant 5,39. Il reste environ 30

1. PETRUSCHKY, *Centralbl. f. Bakt.* B. XIX, p. 187.

à 35 p. 1,000 de lactose. Il doit dédoubler ce sucre et sécrèter une lactase, car il permet à des espèces n'attaquant que le glucose de vivre dans le lait et de produire leur fermentation spéciale quand elles sont en symbiose avec lui. Par contre, il ne touche aux matières albuminoïdes que lorsqu'elles ont subi déjà une première hydratation. Il donne alors des composés ammoniacaux et de l'ammoniaque.

Dans les milieux mixtes, il attaque simultanément les protéoses et les sucres.

Nous verrons, en comparant son action avec celles des autres espèces, que Kosaï a raison de le considérer comme l'agent le plus important de la fermentation lactique dans le lait.

On trouve, dans le tube digestif de l'homme et des animaux, des espèces assez voisines, comme le *B. acidophilus* de Moro[1], et le *B. exilis*, décrit par l'un de nous. Cette dernière bactérie s'en distingue par son absence de culture sur gélatine et sur pomme de terre, et par ses propriétés de fermentation bien moins importantes. Quant au bacille acidophilus, ses cultures ont des caractères absolument différents.

Proteus vulgaris, proteus Zenckeri (Hauser[2]). — Ils sont relativement rares dans le lait. Nous ne les avons isolés qu'une fois dans des échantillons obtenus pendant l'été.

Leurs différentes propriétés sont bien connues, nous n'avons pas à y revenir. Disons simplement que la race de *Proteus vulgaris* isolée se rapprochait de celle que nous avons trouvée dans la putréfaction des viandes. Elle n'avait qu'une action insignifiante sur les sucres.

Bacilles subtilis et mesentericus. — Nous réunissons dans un même groupe ces deux grandes variétés de bactéries si communes. Elles ont, il est vrai, des caractères différentiels appréciables, mais beaucoup de leurs propriétés morphologiques et chimiques autorisent ce rapprochement. Elles sont connues depuis fort longtemps et ont été signalées dans le lait par de nombreux observateurs, Benecke[3], Löfler, Konig, Spickermann, Tilmann, Barthel, etc. Nous les avons rencontrées constamment alors même que les isolements nous montraient la

1. Moro, *Wien. Klin. Wochens.*, n° 5 (1900).
2. Hauser, *Ueber die Faulnissbakt.* Leipzig (1885).
3. Benecke, *Centralbl. f. Bakt.* Bd II, n° 18 (1887).

présence d'anaérobies protéolytiques puissants. On les trouve surtout au début de l'altération du lait avant la coagulation.

Nous devons dire que nous n'avons identifié nos bactéries isolées avec le subtilis, ou le mesentericus, qu'après les avoir minutieusement comparées avec les échantillons conservés dans les collections de l'Institut Pasteur.

Nous savons, depuis les travaux de Péré[1], qu'elles brûlent les corps tertaires sans causer jamais de fermentation acide. Elles agissent plus facilement sur le glucose que sur le lactose.

Elles attaquent les substances protéiques et transforment la caséine en une matière visqueuse, colloïde, amère. Leur action diastasique est arrêtée par une acidité de 1,75 à 2 p. 1,000 en SO^4H^2.

Ces espèces peuvent donc jouer un grand rôle dans la fermentation du lait.

Bacillus lactopropylbutyricus non liquefaciens (espèce nouvelle). — Nous avons trouvé, dans les laits que nous avons eu à examiner, une variété de bacille butyrique anaérobie. Nous en donnerons une description un peu détaillée, car elle ne nous semble pas avoir été décrite jusqu'ici.

Ce bacille est extrêmement fréquent dans le lait sucré et nous l'avons rencontré dans presque tous nos cas. Les divers échantillons isolés avaient des propriétés analogues.

Il se distingue très facilement des autres micro-organismes de la putréfaction du lait. C'est un gros bacille, épais, trapu, plus gros que le *B. perfringens*, présentant souvent dans son milieu une portion renflée dans laquelle brille un corpuscule clair réfringent.

On trouve également, à côté de cette dernière forme, des éléments plus courts, ayant l'aspect de bâtonnets à bouts carrés, se disposant en courtes chaînes de 3 à 4 éléments. Dans les milieux solides, les formes bacillaires sont plus longues, la plupart du temps isolées.

Il se colore bien par les méthodes ordinaires et reste coloré par la méthode de Gram. Comme le fait se produit si souvent, les éléments de vitalité moindre se décolorent par place et même complètement. Il donne des spores, surtout dans les milieux dépourvus de sucre. Ces spores sont arrondies, légèrement

1. PÉRÉ, *Ann. de l'Inst. Pasteur*, t. X, p. 417 (1896).

ovalaires, se forment tantôt au centre du bâtonnet, tantôt à une de ses extrémités. A aucun moment de son développement, même pendant la sporulation, on n'observe de *coloration par l'iode*.

Il est très *mobile*.

Sa vitalité est considérable, grâce à ces spores qui supportent facilement la température de l'ébullition pendant deux minutes. Elles sont tuées au bout de cinq minutes. C'est un *anaérobie strict*, poussant à 20 et à 37°.

Dans la gélose profonde sucrée, au bout de 24 heures, on voit apparaître des colonies régulières, lenticulaires, à bords nets. Quand elles sont bien séparées, elles peuvent atteindre 2 à 3 mm. de diamètre. Le milieu devient rapidement acide et se disloque complètement du fait de la production abondante du gaz. La culture s'arrête d'ordinaire au bout de 4 jours. La date d'apparition des colonies est naturellement en rapport avec la vitalité du bacille. C'est ainsi qu'on peut, dans certains cas, voir les colonies n'apparaître que vers le septième jour. A 20°, elles se montrent encore du troisième au quatrième jour, quand le bacille est bien vivace.

Dans la gélose ordinaire, le développement est précaire.

Dans la gélatine sucrée, les colonies ont la même forme; le milieu se fragmente, mais il n'est jamais liquéfié.

Le bouillon ordinaire se trouble légèrement au bout de 2 à 3 jours. Au fond du tube, il se forme un fin dépôt pulvérulent. Dans le bouillon glucosé, le développement est abondant. Il s'accompagne d'une forte production de gaz, qui fait mousser le liquide et peut même causer l'explosion du ballon. Le milieu devient très trouble et il se forme un dépôt abondant, épais. Il en est de même pour le bouillon contenant du saccharose. Avec de la glycérine, le développement est moins abondant. Il est insignifiant dans les milieux lactosés.

Si l'on ajoute à ces liquides peptonisés, sucrés ou non, des cubes de blanc d'œuf cuit, le développement se fait d'une façon identique, mais jamais l'albumine n'est attaquée, même si l'on a soin d'ajouter du carbonate de chaux en excès.

L'amidon cuit, dans les mêmes conditions, ne présente aucune modification apparente.

Dans le lait stérilisé, il ne se produit jamais de coagulation.

La caséine garde toujours le même aspect, même en présence du carbonate de chaux. Mais, si l'on ajoute du glucose ou du saccharose dans le lait, le milieu devient rapidement mousseux. La caséine se précipite sous forme d'un coagulum dense, rétracté, laissant exsuder un sérum clair. L'adjonction de carbonate de chaux n'empêche pas cette précipitation, car le milieu est encore très acide.

Si nous prenons maintenant un lait spontanément coagulé, stérilisé, et qu'on y ensemence ce bacille, on voit le sérum se troubler rapidement et, comme dans le bouillon glucosé, la production énorme de gaz peut causer l'éclatement du ballon. Le coagulum reste intact. Si, au lieu de ce lait, nous prenons du petit-lait ayant subi la fermentation lactique et stérilisé, nous voyons se produire les mêmes phénomènes.

Ce bacille ne pousse pas dans le milieu d'Utschinsky-Frankel, pas plus que dans le milieu de Pasteur contenant du lactate de chaux[1]. Nous avons composé divers liquides, acides ou non, contenant de l'acide lactique, des lactates (lactates d'ammoniaque, de chaux, etc.) et *peptonisés*. Nous n'avons pas obtenu de développement bien appréciable.

Il pousse cependant dans l'urine ordinaire en troublant légèrement le milieu.

Étudions maintenant ses *propriétés chimiques*.

Ce bacille n'attaque pas l'*amidon*. Il ne possède également aucune action appréciable sur le *lactose*. Nous avons vu en effet que dans le lait stérilisé, il ne se faisait aucune coagulation. L'analyse chimique montre que le lactose est en même quantité que dans les tubes témoins. Il n'est véritablement attaqué que lorsqu'il a été dédoublé par l'action d'autres bactéries, comme le fait se produit pour le lait caillé spontanément ou le petit-lait sûri, stérilisés à 120°. Par contre il attaque vivement le *saccharose* en produisant des acides gras volatils (butyrique et propionique) et de l'acide lactique. Il fait disparaître environ 25 0/0 de ce sucre après 8 jours de culture.

Il attaque surtout le glucose.

L'acidité totale du milieu égale 3 à 4 0/00 en SO^4H^2. Il existe 2,30 environ d'acides volatils pour 1,13 d'acides fixes. L'emploi de la méthode de M. Duclaux montre que les acides volatils sont

1. PASTEUR, *Comptes Rendus de l'Acad. des Sciences*, 1861.

en majorité des *acides butyrique et propionique*, soit en parties égales, soit entre 1 et 2 d'acide butyrique pour 1 d'acide propionique.

Les acides fixes sont composés surtout d'*acide lactique inactif* et d'une petite quantité d'*acide droit*.

En outre, les premières parties du liquide distillé ne donnent pas la réaction de l'aldéhyde. Avec l'iode et la potasse elles donnent une légère odeur d'iodoforme, ce qui nous autorise à dire qu'il ne donne avec le glucose que des *traces d'alcool*.

Ce bacille n'attaque pas le lactate de chaux, le lactate d'ammoniaque, etc., pas plus que l'acide lactique.

Ce bacille attaque encore la *glycérine*. Au bout de 8 jours de culture, il en a fait disparaître près de 80 0/0. Il ne produit pas d'acide avec ce dernier corps.

Les matières albuminoïdes naturelles, les protéïdes, les albumoïdes ne sont pas dédoublées. Elles ne sont attaquées que lorsqu'elles ont subi une première hydratation. Avec les protéoses, ce bacille donne du carbonate d'ammoniaque, de l'ammoniaque, etc., et des traces d'*indol*.

Il attaque, quoique plus faiblement, les dérivés ultimes des subtances protéïques, comme l'*urée*.

Ainsi, en résumé, ce bacille *n'attaque pas l'amidon et le lactose, mais attaque le saccharose et les hexoses* en donnant de l'acide butyrique, propionique, lactique. A cause de ses principales propriétés chimiques, nous lui avons donné le nom de *B. lactopropylbutyricus non liquefaciens*.

Ce *B. lactopropylbutyricus*, dont la description ne concorde avec celle d'aucun autre bacille butyrique, doit être placé dans le dernier groupe immédiatement après le bacille de Fitz, qui, il est vrai, datant de l'époque où on ne faisait pas de cultures sur milieu solide, est assez mal défini.

Bacillus putrificus coli (Bienstock [1]). — On le trouve rarement dans le *lait frais*, où il se développe du reste mal, comme les autres anaérobies, à cause de l'aération du liquide. Il est à remarquer que, lorsqu'il est obtenu de laits vieux de 2 à 3 mois, il a en grande partie perdu de son activité ordinaire, du fait de son séjour prolongé en milieu acide. On peut lui faire

1. Bienstock, *Ann. de l'Inst Pasteur*, 1900-1901.

récupérer par passages successifs en milieux alcalins ou neutres. Nous l'avons isolé d'échantillons recueillis l'été.

Sa description, dans le mémoire de MM. Tissier et Martelly, a donné lieu à des observations parues dans ces Annales [1]. Nous devons donc donner quelques renseignements complémentaires sur les propriétés morphologiques et chimiques de cette espèce.

Tout d'abord, *le bacille trouvé dans la putréfaction de la viande et décrit par ces auteurs sous le nom de B. putrificus est bien le même que celui de Bienstock*. MM. Tissier et Martelly ne l'avaient du reste identifié qu'après avoir montré leurs cultures à M. Bienstock; depuis, ils ont fait parvenir à nouveau à ce savant des échantillons de ce *putrificus* et du *B. bifermentans*, et M. Bienstock n'a pu que confirmer sa première opinion.

Au sujet de ces propriétés chimiques, nous devons également répéter que ce *bacille ne fait fermenter le glucose que d'une façon insignifiante. Les milieux qui en contiennent ne sont jamais nettement acides*. Si l'on dose, en effet, dans des milieux glucosés, la quantité d'acide produite par une des races les plus actives, on trouve des chiffres oscillant entre 1 et 1,47 0/00 en SO^4H^2, *dose insuffisante pour arrêter sa diastase trypsique*. Il peptonise et détruit parfaitement, en milieux glucosés, non seulement la viande et la fibrine, mais aussi le blanc d'œuf cuit. Nous avons encore répété ces expériences, elles ont été toutes concluantes.

Si nous voulons nous rendre compte de la marche de cette acidité dans un milieu mixte, contenant 50 grammes de viande et 20 grammes de glucose pour 1,000, nous obtenons les chiffres suivants : acidité au bout de 6 jours à 37° = 1,47, de 12 jours = 1,47, de 24 jours = 0,98, de 30 jours = 0,49, de 45 jours = 0. Au bout de deux mois, la viande a complètement disparu et la réaction du milieu est alcaline.

Il ne fait donc pas fermenter activement le sucre. Il le brûle, comme le *subtilis*, le *mesentericus*, il le fait disparaître des cultures entre 15 et 20 jours. Le *vibrion septique* possède exactement la même action, il donne même une acidité plus élevée, 1,715 0/00 en SO^4H^2 dans des milieux identiques, et il attaque pourtant nettement, dans les milieux sucrés, la matière albuminoïde.

1. Achalme, Observations sur le mémoire de MM. Tissier et Martelly, 1903, *Ann. de l'Inst. Pasteur*.

Le bacille du tétanos, lui, ne donne jamais d'acides, mais il brûle également le glucose. Au bout de 20 jours il n'en reste que 4 grammes au lieu de 15 0/00. Ces bactéries, *B. putrificus* et *vibrion septique* servent donc de termes de passage entre ce *bacille du tetanos* et les *ferments protéolytiques mixtes* qui, eux, donnent toujours une *fermentation acide véritable*, empêchant l'action de leur diastase trypsique.

Nous avons voulu voir à quoi tenaient ces résultats si différents de ceux de M. Achalme, et nous avons pu nous rendre compte, avec notre *technique pourtant insuffisante*, que les cultures de ce putrificus, provenant des collections de l'Institut Pasteur, et ayant servi aux expériences de cet auteur, contenaient, à côté de cette dernière bactérie, quelques colonies d'une espèce analogue au *B. bifermentans*.

Levure du lactose. — Nous avons trouvé dans un cas une espèce de ce genre attaquant le lactose, le glucose, etc., en donnant de grandes quantité d'*alcool éthylique* et une petite quantité d'acide, atteignant au total 0,98 0/000 en SO^4H^2.

Elle agissait également, comme la plupart des espèces du même genre sur les substances protéiques et peptonisait la caséine. Nous n'en avons pas poursuivi l'étude.

Oïdium lactis. — Il est très fréquent dans le lait. Il existe dans 6 de nos observations sur 10. Grâce à ses propriétés chimiques complexes, attaque des sucres, des acides, des albumines, il joue un rôle essentiel dans la fermentation du lait, comme nous le verrons plus loin.

Rhizopus nigricans. — Ce champignon est moins fréquent que l'espèce précédente, mais il est également appelé à jouer un rôle important, son action étant comparable à celle de l'oïdium.

GROUPEMENT DES BACTÉRIES DE LA FERMENTATION DU LAIT ; LEUR ACTION COMPARÉE

Dans la putréfaction de la viande de boucherie, les bactéries isolées peuvent, schématiquement, se grouper en deux grandes catégories :

Les *ferments mixtes*, d'une part, qui attaquent simultanément les albuminoïdes et les hydrates de carbone en produisant des acides. Ils se subdivisent en *protéolytiques mixtes* et en *peptolytiques mixtes*.

Les *ferments simples*, d'autre part, qui localisent leur action sur la matière protéique et qui se subdivisent également en *protéolytiques simples* et *peptolytiques simples*.

Il existe en outre dans la viande des espèces essentielles, constantes, appartenant à ces deux catégories qui, dans certains cas, peuvent se nuire, mais qui, dans les conditions normales, amènent une rapide putréfaction.

Nous allons voir maintenant que dans le lait il existe aussi des *espèces constantes*, *ferments simples* et *ferments mixtes*, mais que l'action de ces derniers est, à un moment donné, *nettement empêchante* pour les autres.

En résumant nos observations, nous trouvons :

Obs. I. — Entérocoque. — B. coli. — Bac. acidiparalactici. — Bac. putrificus	Rhizopus.
Obs. II. — Entérocoque. — B. coli. — Bac. acidiparalact. — Mésent. fuscus. — Bac. lactopropylbutyricus	Oïdium lactis.
Obs. III. — Entérocoque. — B. coli. — Bac. acidiparalact. — Subtilis. — Bac. fœcalis alcalig. — Bac. lactopropylbut	Proteus Zenkeri.
Obs. IV. — Entérocoque. — Bac acidipararalact. — Staphyl. albus. — Subtilis. — Bac. fœcalis. — Bac. lactopropylbut	Oïdium lactis.
Obs. V. — Entérocoque. — Bac. acidiparalact. — Mesent. ruber. — Bac. lactopropylbut. — Bac. fœcalis...	Rhizopus.
Obs. VI. — Entérocoque. — Bac. coli. — Bac. acidiparalact. — Mesent. ruber. — Bac. lactopropylbut	....
Obs. VII. — .... Bac. acidiparalact. — Bac. putrificus. — Proteus vulgaris. — Bac. fœcalis	Oïdium lactis.
Obs. VIII. — Entérocoque. — Bac. acidiparalact. — Subtilis (?) — Bac. fœcalis. — Bac. lactopropylbut. — Levure	Oïdium lactis.
Obs. IX. — Entérocoque. — Bac. acidiparalact. — Mes. ruber. — Staphyl. albus	Oïdium lactis.
Obs. X. — Entérocoque. — B. coli. — Bac. acidiparalact. — Subtilis. — Bac. fœcalis. — Bac. lactopropylbut.	Oïdium lactis.

Ainsi, il y a donc un certain nombre de bactéries *constantes : entérocoque*, *B. coli*, *Bac. acidiparalactici*, *subtilis-mesentericus*, *Bac. fœcalis alcaligenes* et *Bac. lactopropylbutyricus*, et un champignon également presque constant : *oïdium lactis*.

Nous voyons également que ces bactéries peuvent se grouper d'après leurs caractères chimiques en :

1° *Ferments mixtes.* — Protéolytiques mixtes : *staphylocoques* et peptolytiques mixtes : *entérocoque, Bac. acidiparalactici, Bac. lactopropylbutyricus, B. coli ;*

2° *Ferments simples.* — Protéolytiques simples : *subtilis, mesentericus, Bac. putrificus, proteus vulgaris,* et peptolytiques simples : *proteus Zenkeri, B. fœcalis alcaligenes.*

Cherchons maintenant à déterminer comment toutes ces espèces, bactéries et champignons, combinent leur action pour amener la destruction de tous les éléments contenus dans le lait.

Étudions d'abord l'action des *ferments mixtes.*

Nous savons qu'ils peuvent produire de l'acide lactique et de 'acide butyrique.

La *fermentation lactique* est certainement la plus importante. Nous avons, dans la plupart des cas, isolé 3 espèces susceptibles de la produire : l'*entérocoque,* le *B. coli,* le *B. acidiparalactici.*

L'*entérocoque* produit de l'acide lactique inactif, mais il donne encore de l'acide acétique, formique, valérianique. Son action fermentative s'arrête avec une acidité de 2 à 2,45 0/000 en SO^4H^2.

Le *B. coli,* un peu plus rare que l'espèce précédente, donne aussi de l'acide lactique, mais de l'acide gauche. Son action s'arrête avec une acidité variant entre 0,65 et 2 0/000. Ce ne sont donc pas de véritables ferments lactiques.

Le *bacillus acidiparalactici* est autrement plus actif. Il donne presque exclusivement de l'acide droit. Il est beaucoup plus résistant. Son action ne s'arrête que lorsque le milieu possède une réaction équivalente à 4 à 6 0/000 de SO^4H^2.

Réunissons maintenant ces 3 espèces dans le lait stérilisé. Il se produit d'abord un développement égal, puis l'examen microscopique nous montre que la première espèce arrêtée sera le B. coli, puis ensuite l'entérocoque, et enfin en dernier lieu le bacille paralactique, alors que l'acidité totale atteindra un chiffre 3 fois plus fort que celui atteint isolément par chacune des 2 premières bactéries. Ce bacille supplée donc aux deux autres et continue leur action. L'analyse chimique nous montre que les acides produits au début, dans cette symbiose, sont indifféremment des acides fixes et des acides volatils, mais au bout de peu de temps l'acide lactique droit est en quantité dominante. Comme c'est précisément celui que produit le bacille paralactique, on voit que Kosaï

avait raison de le considérer comme l'espèce la plus active et la plus importante.

La *fermentation butyrique* semble, par contre, d'après nos observations, causée par une seule espèce : le *bacillus lactopropylbutyricus non liquefaciens*. Il est impossible de l'obtenir avec du lait ordinaire stérilisé. Elle ne se produit que lorsqu'on ajoute au milieu du saccharose, du glucose, ou un sucre analogue. Mais on peut l'obtenir avec du lait caillé stérilisé ou du petit-lait acide également stérile.

Ainsi, cette fermentation butyrique, dans le lait, ne peut se produire qu'aux dépens d'un glucose. Pour se faire aux dépens du lactose, il faudra qu'il y ait eu un dédoublement dû aux ferments lactiques. Elle nous apparaît donc comme étant sous la dépendance de ces dernières bactéries. Elle commence après la fermentation lactique, se produit en même temps qu'elle, mais finit avant elle, puisque une acidité de 4 0/000 arrête l'action du bacille lactopropylbutyrique.

Étudions maintenant l'action des *ferments simples*.

Nous avons isolé des aérobies stricts, comme le *subtilis*, ou faiblement anaérobies facultatifs, comme le *mesentericus*, et enfin, plus rarement, dans des échantillons d'été, le *proteus vulgaris* et le *B. putrificus* de Bienstock, toutes *protéolytiques simples*.

Les deux premières se développent bien dans le lait stérilisé. Elles brûlent une faible quantité de lactose. Elles précipitent la caséine au moyen d'une *présure*, puis la peptonisent du fait d'une *diastase trypsique*. Elles produisent ainsi des caséoses, des amines, de la tyrosine, de la leucine, des acides gras, des composés ammoniacaux. La caséine se trouve ainsi transformée en une substance muqueuse, visqueuse, amère, ne dégageant aucune odeur désagréable. Ces bactéries sont aussi capables de détruire de la viande de boucherie sans produire aucune fétidité.

Le *B. putrificus* a une action tout autre. Il ne touche pas plus au lactose, mais il disloque rapidement la molécule de caséine en donnant les mêmes produits qu'avec la viande. Il précipite d'abord la caséine, probablement par le fait d'une présure, puis la fait disparaître en donnant des caséoses, des amines, de la leucine, de la tyrosine, des acides butyrique, acétique, valérianique, etc., en dégageant une odeur très fétide rappelant celle du fromage de Münster.

Les *peptolytiques simples*, comme le *B. fœcalis alcaligenes* et le *proteus Zenkeri*, joints à ces cultures, compléteront l'action de ces protéolytiques en agissant sur les dérivés ultimes des substances albuminoïdes du lait.

Réunissons maintenant dans une même culture les ferments mixtes et les ferments purs. Au début, il y a attaque simultanée du sucre et de l'albumine, se traduisant d'une part par la présence d'acides fixes, et d'autre part par la présence de protéoses et d'ammoniaque, mais rapidement, au bout de 8 à 10 jours, toute fermentation s'arrête. Le milieu se conservera ainsi pendant des mois.

Les ferments mixtes ont paralysé l'action des ferments simples du fait des acides qu'ils ont produits en dédoublant le sucre, et ces acides ne tarderont pas à les arrêter à leur tour. Le lait alors ne se gâtera plus, conservant une certaine quantité de lactose et la plus grande partie de sa caséine.

Si cette acidité se prolonge, si elle n'est pas neutralisée rapidement, l'activité fermentative de ces diverses espèces semble s'amoindrir. Ainsi le bacille putrificus, isolé d'un lait acide depuis 2 à 3 mois, a perdu en grande quantité son pouvoir protéolytique pourtant si puissant.

Ainsi, d'après ce que nous venons de dire, les *bactéries sont impuissantes à parfaire à elles seules la transformation du lait* dans les conditions habituelles. Il faut l'intervention d'espèces d'un ordre plus élevé, susceptibles de détruire les acides, de brûler le lactose, de dédoubler la caséine. Les champignons peuvent remplir ce triple but. C'est pourquoi, constamment, nous avons trouvé certaines variétés: l'*oïdium lactis*, le *rhizopus nigricans*. Leur présence n'est pas fortuite, elle est essentielle. Ils se développent bien dans ce milieu acide. Ils neutralisent le liquide, et favorisent ainsi les pullulations momentanément arrêtées.

MARCHE D'UNE FERMENTATION SPONTANÉE DU LAIT

Nous venons de voir comment ces diverses bactéries se groupent pour produire les trois grandes fermentations du lait. Nous devons maintenant indiquer dans quel ordre elles apparaissent dans la fermentation spontanée, *ou du moins comment elles sont apparues dans les cas que nous avons observés.*

Tout d'abord, comme l'ont déjà vu de nombreux auteurs, *le lait contient, à sa sortie de la laiterie, tous les germes nécessaires à sa complète putréfaction*, germes qui ne se multiplieront que lorsque le milieu leur est devenu favorable.

Un peu après la traite, en effet, la réaction se modifie. Elle devient légèrement acide, parfois même légèrement alcaline (Freudenreich[1]). L'analyse indique déjà de très faibles traces de peptone et d'ammoniaque. Le lactose diminue légèrement. Le poids d'extractifs, déduction faite du sucre, est insignifiant. Il y a donc eu action certaine sur les albumines et sur le lactose. C'est ce que démontre l'examen bactériologique. L'espèce la plus nombreuse, celle qui pullule d'abord, est bien, comme l'ont indiqué W. Conn et W. H. Esten, ce petit streptocoque que nous avons identifié à l'*entérocoque*.

Après lui vient le *B. coli*. A côté de ces deux espèces dominantes, les isolements montrent quelques rares colonies des diverses espèces que nous avons signalées plus haut.

Ainsi, dans le lait comestible, il s'est déjà produit des modifications du fait de l'*action simultanée des ferments mixtes et des ferments purs*.

Au bout de 2 à 4 jours en moyenne, plus rapidement en été, le lait se coagule. Le caillot est d'abord mou, gélatineux, laisse exsuder un sérum qui filtre louche. La caséine et la matière grasse ont très légèrement diminué. La peptone et l'ammoniaque sont plus facilement décelables à l'analyse. Le poids d'extractifs augmente peu. Le lactose par contre diminue. La réaction du lait est alors nettement acide. L'acidité totale oscille entre 1,47 et 2 p. 1,000 en SO^4H^2.

Il y a peu d'acide lactique, qui est *inactif*.

La méthode de M. Duclaux décèle un mélange d'*acide acétique* et un autre acide très volatil, *valérianique* ou *butyrique*.

Or, à cette époque, les isolements montrent que l'*espèce dominante est l'entérocoque*, qui donne avec le lactose de l'acide inactif, des acides acétique et valérianique. Nous pouvons donc admettre que la *coagulation spontanée du lait est en grande partie le fait de cette espèce*.

Mais est-ce au moyen d'une présure ou par simple acidification? Cette bactérie, cultivée dans du lait contenant un excès de

1. Freudenreich, *Revue du lait*, n° 16, 30 mai (1903).

carbonate de chaux, ne le coagulait pas, mais la faible acidité (1,47 à 2 p. 1,000) produite par cet entérocoque suffit à expliquer la coagulation.

Trois à quatre jours après la coagulation spontanée, le caillot se modifie. Il est dense, rétracté, le sérum exsudé filtre plus clair, est plus abondant. Le lactose a encore diminué. Il est de 20 à 30 p. 1,000. L'acidité totale augmente encore (2,70 à 4 p. 1,000). L'acide est en majorité de l'*acide lactique droit*. L'examen bactériologique montre *qu'une autre espèce est devenue dominante et s'est substituée à l'entérocoque, c'est le bacille acidiparalactici*. L'explication de ce fait réside dans la réaction du milieu. Le B. coli, l'entérocoque sont arrêtés par cet excès d'acide. Seul des ferments lactiques, le bacille paralactique peut résister, se développer et jouer alors le premier rôle. Les ferments protéolytiques : *subtilis*, *mesentericus*, *putrificus* subiront eux aussi l'action empêchante de l'acide. Leur diastase trypsique ne peut plus agir sur la caséine. Ils tendent à disparaître et donnent des spores.

A ce moment, les champignons commencent à se développer, ils trouvent un milieu favorable. L'*oïdium lactis*, le *rhizopusnigricans* commencent à former sur la crème une mince couche duvetée. Ils attaquent les acides. Cette action neutralisante ne peut donc que favoriser encore l'action du paralactique, mais elle n'est pas encore suffisante pour permettre la reprise de l'action des protéolytiques arrêtés.

Vers le 8e ou 10e jour après la coagulation, l'analyse montre que les acides volatils augmentent à nouveau. Ce sont alors des *acides butyrique* et *propionique*. A côté du paralactique on voit se développer le *Bac. lactopropylbutyricus*.

Son développement tardif ne peut s'expliquer que par ce que cet anaérobie a non seulement besoin d'un liquide désaéré et maintenu à l'abri de l'oxygène par la couche de moisissure, mais aussi d'un sucre analogue au glucose ou au galactose. Les champignons et le ferment paralactique remplissent cette double condition.

L'action de ce butyrique vient s'ajouter à celle du paralactique et l'acidité totale augmente brusquement. Elle atteint vers le 14e au 15e jour 5, 6 et même 7 p. 1,000. Le lactose disparaît rapidement. L'action de ces deux ferments mixtes s'arrête à son tour.

Au bout d'un mois, cette acidité commence à baisser. La surface du lait est toujours couverte d'une couche épaisse de moisissures. Il est encore acide au bout de deux mois (2 gr. 64 0/00 en SO^4H^2). Les matières albuminoïdes diminuent, les protéoses, l'ammoniaque augmentent avec le poids d'extractifs lorsque la réaction deviendra inférieure à 2 0/000. Les examens bactériologiques montrent alors que les ferments lactique et butyrique ne sont plus l'espèce dominante. A côté d'eux se développent des cocco-bacilles décolorés par le Gram, *Bac. fœcalis alcaligenes*, ou d'autres bacilles comme le *proteus Zenkeri*. L'*oïdium lactis* ou le *rhizopus nigricans*, jouant alors le rôle de protéolytiques, détruisent la caséine et tendent à neutraliser de plus en plus le milieu.

Au bout de 3 mois, la caséine est transformée en une masse visqueuse coulante, très légèrement fétide, le sérum se colore en jaune brun. La couche de moisissure se désagrège, tombe petit à petit au fond du vase. Les ferments simples pullulent à leur tour et, parmi eux, les *bactéries peptolytiques*.

Au bout de 10 mois, il ne reste qu'un dépôt filant jaunâtre, fétide. La lactalbumine et la lactoglobuline ont disparu, ainsi que les peptones. Le poids d'extractifs diminue également, indice que les produits de désintégration sont attaqués à leur tour. L'analyse chimique nous montre encore de la leucine, de la tyrosine, des acides gras, volatils, de l'ammoniaque, etc. Les bactéries peptolytiques achèvent donc de détruire les dérivés ultimes des matières albuminoïdes.

Telle est la forme la plus habituelle de la fermentation du lait. Il peut évidemment s'en produire d'autres, suivant la variété de moisissure et suivant la nature aérobie ou anaérobie des ferments protéolytiques. Mais, en général, les champignons impriment à la marche générale un caractère plus marqué que les bactéries. Nous avons bien noté avec le *Bac. putrificus* une odeur plus fétide et peut-être une désintégration plus rapide de la caséine, et ces différences sont, surtout dans les échantillons d'été, assez importantes. Elles sont cependant plus marquées quand on empêche ou ralentit le développement des moisissures. Leur rôle est si important que l'on peut de ce fait ralentir ou arrêter le processus de destruction.

En résumé, nous voyons qu'on peut considérer deux phases:

1° *Phase des ferments mixtes*, causant une fermentation acide complexe, puis une fermentation lactique et enfin une fermentation lactique, propionique et butyrique.

Les ferments simples agissent simultanément jusqu'à la coagulation du lait.

Les *champignons* détruisent les acides produits et attaquent la caséine.

2° *Phase des ferments simples* qui achèvent l'attaque de l'albumine et de ses dérivés ultimes.

Donc, si, dans ses lignes générales, la putréfaction du lait se rapproche de celle de la viande, il est évident que, dans le détail, il existe de grosses différences dont les principales portent sur la longue durée, la fétidité moindre, la présence constante et essentielle de moisissures, etc.

Elles sont probablement dues à la quantité et à la nature du sucre du lait qui exige, pour sa destruction, la présence de ferments très actifs dont les déchets empêcheront ou gêneront la destruction de la caséine et à la nature de cette albumine en solution ou en suspension dans un liquide aéré (Marshall[1]). Cet ensemble de circonstances rend nécessaire la présence des moisissures et empêche l'action des protéolytiques et surtout des anaérobies, qui, lorsque le milieu leur sera redevenu favorable, auront, en grande partie, perdu leur activité première.

ROLE PATHOGÉNIQUE DES MICROBES DE LA PUTRÉFACTION HABITUELLE

Nous devons nous demander maintenant si ces bactéries putréfiantes banales peuvent causer chez l'homme, du fait de leur ingestion, des troubles digestifs quelconques. La question est surtout importante pour le lait, aliment quotidien, employé surtout pour les nourrissons et les enfants en bas âge.

On a du reste depuis fort longtemps incriminé ces microbes, causant son altération dans la genèse d'un certain nombre de maladies et notamment les gastro-entérites des nourrissons. Nous savons que, pour ces dernières, il n'existe que deux grandes causes : les *intoxications* et les *infections ectogènes*. On doit laisser de côté, jusqu'à nouvel ordre, les anciennes infections endogènes qui ne seraient causées que par des saprophytes

1. MARSHALL, L'aération du lait, *Revue générale du lait*, 1902. *Centralblatt f. Bakt.* II Abth., IX, p. 313.

de l'intestin normal, devenus subitement virulents sous l'influence de causes extérieures.

On a cherché à expliquer les *gastro-entérites infectieuses* par la pénétration dans l'organisme des bactéries de la putréfaction habituelle du lait. On a incriminé soit des espèces banales : *Bact. lactis aerogenes, B. coli, streptocoque du lait, Bac. subtilis, Bac. mesentericus*, etc., soit des espèces plus rares comme le *proteus vulgaris, Bac. pyocyaniques*, etc., en se basant sur leur virulence étudiée par la méthode des injections sous-cutanées ou intraveineuses.

Pour les *gastro-entérites toxiques*, on a invoqué la présence de substances toxiques de provenance microbienne, isolées soit du lait, comme le *tyrotoxicon* produit par une espèce butyrique (Vaughan) ou la *spasmotoxine* (Brieger), soit de la viande pourrie comme certaines bases toxiques *ptomaïnes* (Selmi, Gauthier). Nous devons donc chercher si, sans préparation aucune du terrain, on peut produire des troubles digestifs chez l'homme ou chez les animaux, par la simple ingestion de ces microbes, soit isolés, soit réunis avec tous leurs produits de culture dans un lait ou une viande pourrie.

Nous avons pris, comme sujet d'expérience, des hommes adultes normaux et des chiens. Pour étudier les mêmes effets chez de jeunes sujets nous avons pris de jeunes chats ou de jeunes chiens dont nous connaissions la flore intestinale.

I. — Expériences faites avec des cultures pures récentes. Le *bacille lactopropylbutyrique* a été donné, plusieurs jours de suite, à cinq jeunes chats dont les uns étaient laissés à la mère, les autres nourris au lait stérilisé. Ils étaient tous d'âge différent et de portée différente. Nous n'avons obtenu aucun trouble digestif ni aucune modification de la flore intestinale, appréciable à l'examen microscopique.

L'*entérocoque*, le *Bac. fœcalis alcaligenes* nous ont donné des résultats identiques. Seule une culture de *Bac. mesentericus* parmi toutes les espèces du lait a produit, chez un jeune chat de 7 jours à la mère, une baisse de poids, et chez un autre animal de 12 jours, nourri au lait stérilisé, une diarrhée légère.

Les microbes de la putréfaction de la viande de boucherie n'ont, dans des conditions identiques, produit aucun trouble digestif appréciable.

II. — Expériences faites avec du lait ou de la viande pourrie, *c'est-à-dire contenant toutes les espèces avec leurs produits de culture.* Le lait acide, ayant subi la fermentation lactique et butyrique, n'est d'ordinaire nullement nuisible pour les animaux en lactation, soit à la mère, soit au lait stérilisé. Nous avons fait, à ce sujet, de nombreuses expériences, et nous n'avons noté qu'une légère diarrhée chez un jeune chien nourri au lait stérilisé d'une façon insuffisante.

Chez un enfant de 4 mois alimenté au sein, mais dans des conditions de nutrition également défavorables par suite d'accidents survenus à la mère, l'ingestion de 5 grammes de crème acide a causé une diarrhée peu grave, accompagnée d'une baisse de poids. Les selles n'ont repris leur aspect microscopique normal qu'au bout de huit jours.

Chez l'adulte, àla dose d'un litre de petit-lait acide par jour, nous n'avons obtenu aucun trouble appréciable au bout de 8 jours. M. Metchnikoff[1] a vu au contraire que, dans certaines conditions, il pouvait avoir une influence favorable.

Le lait redevenu neutre ou alcalin, ayant subi une fermentation avancée, ne semble pas causer de véritables troubles digestifs. Nous avons donné à de jeunes animaux des doses répétées pendant 8 jours, nous les avons même nourris exclusivement pendant 48 heures avec ce liquide sans résultats notables. Au bout d'un certain temps, nous avons constaté des vomissements, une répugnance insurmontable, mais ni diarrhée, ni constipation, ni modification microscopique de la flore intestinale.

Nous avons refait ces expériences, en nous servant de viande en complète putréfaction, chez des animaux nourris à la mère ou au lait stérilisé, ou chez des animaux adultes. Les résultats ont été les mêmes. Chez 2 hommes adultes normaux, âgés l'un de 36 ans et l'autre de 34, qui ont bien voulu se prêter à nos expériences, il ne s'est également produit aucune baisse de poids, aucun malaise, aucun trouble digestif quelconque.

Ainsi, en résumé, les bactéries ordinaires de la putréfaction du lait ou de la viande, en cultures pures et récentes, ne causent aucun trouble immédiat grave quand elles sont ingérées par des sujets normaux et bien portants. Ces résultats n'ont rien d'éton-

1. Metchnikoff, *Etudes sur la nature humaine*. Paris, 1903.

nant, si l'on veut bien se rendre compte que tout lait ou toute viande commerciale, crue, qui sont de consommation courante, contiennent toutes les espèces de la putréfaction. Les produits complexes des cultures anciennes ne présentent pas un plus grand danger dans des conditions identiques. Elles ne sont nuisibles que lorsque le sujet qui les ingère est soumis à une alimentation insuffisante, défectueuse, et possède une résistance moindre, en un mot quand il existe des *causes prédisposantes*. Ces faits semblent en contradiction avec les cas indubitables d'empoisonnement par des aliments altérés; mais, dans ces cas, la cause pathogène est alors due non pas aux microbes banals de la putréfaction, mais à l'intervention de microbes spéciaux comme le bacille de Van Ermenghen. Du reste, dans beaucoup de ces observations, les aliments incriminés n'avaient nullement l'aspect de matière en putréfaction.

CONCLUSIONS

Toutes les espèces causant la putréfaction habituelle du lait, c'est-à-dire la destruction complète de tous ses éléments, sont contenues dans le lait à sa sortie de la laiterie.

Dans les échantillons que nous avons examinés, il existe des micro-organismes *constants*, bactéries et champignons.

Les *bactéries* se divisent en 2 groupes :

1° Des ferments mixtes, protéolytiques mixtes : *staphylocoques* assez rares et peptolytiques mixtes : *entérocoque*, *B. coli*, *Bac. acidiparalactici*, *Bac. lactopropylbutyricus*;

2° Des ferments simples, protéolytiques simples : *mesentericus*, *subtilis*, *Bac. putrificus*, *proteus vulgaris*, et peptolytiques simples : *Proteus Zenkeri*, *Bac. fæcalis alcaligenes*.

Les champignons sont : l'*oïdium lactis*, le *rhizopus nigricans* et, dans un cas, une *levure du lactose*.

Dans le lait stérilisé, les ferments mixtes donnent lieu à 2 fermentations principales : la *fermentation lactique* du fait de trois espèces : l'entérocoque et le B. coli, peu actifs, et le *bacillus acidiparalactici* possédant une résistance plus grande et un pouvoir ferment plus grand. Il donne surtout de l'acide lactique droit.

La *fermentation butyrique* du fait d'une seule espèce, le Bac. lactopropylbutyrique. Elle ne se produit pas aux dépens de l'acide

lactique ou des lactates, mais aux dépens d'un sucre analogue au glucose, provenant du dédoublement du lactose par les bactéries précédentes. Elle se trouve donc ainsi indirectement sous la dépendance de la fermentation lactique.

Les ferments simples *peptonisent et détruisent la caséine*, mais en symbiose avec les ferments mixtes, ils sont rapidement arrêtés par la réaction acide du milieu. Ces bactéries sont donc impuissantes à parfaire à elles seules la putréfaction du lait. L'intervention d'organismes à fonctions plus élevées comme l'oïdium lactis et le rhizopus nigricans devient nécessaire.

La marche d'une putréfaction nous a paru toujours la même.

Les *ferments mixtes* se développent rapidement, aidés par l'action simultanée des ferments simples.

L'entérocoque est d'abord l'espèce dominante produisant de l'acide lactique inactif, de l'acide valérianique et surtout de l'*acide acétique*. Le B. coli vient ensuite, donnant de l'acide lactique gauche. Ils donnent ensemble une acidité de 1,47 à 2 p. 1/000 (en SO^4H^2) qui arrête l'action des protéolytiques et amène la *coagulation* du lait.

Le bacille acidiparalactici continue la destruction du lactose et donne lieu à la véritable fermentation lactique en donnant surtout de l'*acide lactique droit*.

Le bacille lactopropylbutyrique se développe alors, le milieu lui étant devenu favorable, et produit de l'acide lactique inactif et surtout de l'*acide propionique* et *butyrique* jusqu'à ce qu'une acidité totale de 4 à 6 p. 1/000 (en SO^4H^2) arrête toute action bactérienne.

L'oïdium lactis et le rhizopus nigricans interviennent, et, brûlant les acides et le lactose restant, et détruisant ensuite la caséine, favorisent la pullulation des espèces momentanément arrêtées.

Les *ferments simples* peuvent alors achever l'attaque de la caséine et de ses dérivés ultimes.

Les bactéries de la putréfaction ne causent de troubles digestifs, du fait de leur ingestion chez l'homme ou les animaux, que si le milieu leur est favorable, si le terrain leur est préparé, s'il existe, en un mot, des *causes prédisposantes*.

Les accidents de botulisme sont dus à des espèces spéciales, différentes des espèces habituelles de la putréfaction.

LA GAROTILHA

PAR E. MARCHOUX ET A. SALIMBENI

I

Sous le nom de Garotilha, on connaît au Brésil une maladie qui sévit sur les bovidés, et qui est caractérisée par l'engorgement des ganglions cervicaux, avec infiltration œdémateuse du cou. Cette maladie presque toujours mortelle évolue en 3 ou 4 jours. Parfois elle revêt un caractère de gravité exceptionnelle, et l'animal meurt presque foudroyé. Dans ce cas, les bouviers lui donnent le nom de peste. Très rarement on rencontre des animaux qui guérissent.

II

Les bœufs destinés à la consommation de la ville de Rio de Janeiro sont achetés dans l'intérieur par les entrepreneurs d'abattage qui les réunissent en troupeaux considérables dans les plaines de Santa-Cruz. Celles-ci sont situées à 2 heures de chemin de fer de la capitale, autour de la petite ville du même nom, dans laquelle se trouvent les abattoirs municipaux.

Ce nombreux approvisionnement est nécessité par le fait que les animaux, provenant de régions très éloignées par groupes de 500, 600 têtes et plus, arrivent fatigués de ce long voyage par des routes poussiéreuses, et ont besoin de se reposer et de se remettre en chair avant d'être abattus.

Pendant les quelques semaines qu'ils passent dans les pâturages de Santa Cruz, il y en a toujours un certain nombre qui meurent. Dans les périodes de sécheresse, ce nombre peut être quotidiennement très élevé, de façon à constituer une véritable épizootie.

Souvent les gardiens trouvent, le matin, mortes dans les champs, des bêtes dont ils n'avaient pas constaté la maladie. Les cadavres leur sont signalés de loin par les vols de vautours qui tourbillonnent au-dessus. Dès qu'ils en ont reconnu la présence, il les font enlever par des voitures qui les portent au fondoir.

Il arrive souvent qu'on ne constate la maladie qu'à l'abatage, par cet œdème particulier de la région cervicale.

III

Cette affection a préoccupé depuis longtemps les autorités municipales et les entrepreneurs d'abattage. Déjà M. le professeur Chapot-Prévost avait constaté la présence de la bactéridie charbonneuse dans la Garotilha. Après lui, MM. Gomez et Terni ont vérifié l'exactitude de cette découverte. Nous ne croyons pas, d'ailleurs, que ces divers rapports aient été publiés.

Nous en ignorions l'existence lorsque, dans une conversation particulière avec un des entrepreneurs d'abattage, cette maladie nous ayant été présentée sous un jour assez singulier, nous avons accepté l'invitation qui nous était faite d'aller voir de près les animaux malades.

Le premier bœuf que nous ayons vu était mort pendant la nuit sur le pâturage.

L'autopsie en est faite sur place. La région cervicale paraît tuméfiée. A l'ouverture de la peau, il s'écoule un liquide jaune citron, transparent. Le tissu cellulaire sous-cutané est œdématié, rempli de sérosité. Ce liquide séreux devient sanguinolent quand on approche de la couche inférieure, qui contient une tumeur volumineuse, noire, chargée de sang. A la coupe, on s'aperçoit qu'elle est constituée par un amas ganglionnaire, où les ganglions sont unis entre eux par du tissu congestionné. On ne pourrait pas mieux comparer l'aspect de ces ganglions qu'à celui d'un bubon pesteux. Quelques-uns sont ramollis, pleins de sang; d'autres contiennent des foyers hémorragiques nombreux qui les font paraître marbrés. Les ganglions sous-glossiens et rétro-pharyngiens ne forment presque qu'un seul paquet.

L'œdème gélatineux s'infiltre dans le tissu cellulaire intermusculaire, et forme une espèce d'œdème déclive qui arrive jusqu'au poitrail.

Les ganglions de l'aisselle et de l'aine ne sont pas volumineux. Les vaisseaux sous-cutanés sont remplis, comme injectés.

Le sang du cœur est noir et poisseux. Tous les organes

présentent de la congestion, notamment le foie et la rate qui est énorme, noire et friable.

A l'abattoir, nous avons trouvé un second bœuf qui avait été apporté des champs au fondoir. Les résultats de l'autopsie ont été les mêmes.

Enfin, nous avons vu mourir sous nos yeux un animal frappé de cette forme qualifiée de peste par les bouviers. Quoique chez celui-ci la tuméfaction cervicale ne fût pas apparente, nous avons néanmoins rencontré à l'autopsie les mêmes lésions que chez les deux autres, à cette différence qu'elles étaient peut-être plus caractéristiques encore.

Le liquide de l'œdème, le suc ganglionnaire, le sang du cœur, la pulpe de rate et celle du foie, examinés en préparations colorées, nous ont permis de constater chez les trois bœufs la présence de la bactéridie charbonneuse. Les mêmes pulpes d'organes et les mêmes liquides ensemencés sur gélose et en bouillon de bœuf peptonisé ont donné des cultures, pures pour la plupart, de *bacillus anthracis*.

La garotilha et la peste des bouviers sont donc une même maladie, et celle-ci n'est autre que la fièvre charbonneuse.

IV

Comment se fait l'infection des animaux ? La présence constante de l'infiltration charbonneuse des ganglions sous-glossiens et rétro-pharyngiens porte à penser que le virus pénètre par la bouche. L'absence de lésions aussi caractéristiques dans les autres parties du corps, le peu de volume des ganglions mésentériques en particulier, nous poussent à admettre cette opinion, qu'appuient, d'ailleurs, certaines expériences de Pasteur. Elle est encore appuyée par les cas de guérison, nombreux au dire des bouviers, qui se produisent après traitement, quand la maladie est observée assez tôt.

Dès qu'un animal est triste et se sépare des autres, quand il reste autour de l'abreuvoir, on le *lasse*, on le couche et, si à la palpation on trouve une tuméfaction de la région cervicale, on traverse la peau du cou avec un fer rouge. La majorité des bêtes ainsi traitées, guériraient. Nous avons eu l'occasion d'en voir quelques-unes dans les champs, encore un peu maigres;

mais en voie de guérison. S'il est possible de guérir le charbon par ce moyen, il faut bien admettre qu'il reste primitivement localisé dans les ganglions cervicaux.

L'infection par la bouche, quoiqu'on n'y rencontre pas de lésions apparentes, est bien facile à expliquer. Les pâturages dans lesquels paissent les animaux sont loin d'être de première qualité. L'herbe la plus commune, et la seule qui résiste à la sécheresse, est une herbe à feuilles larges, dures et tranchantes sur les bords. L'organe de préhension du bœuf étant la langue, il est supposable que les animaux se font assez facilement de petites coupures peu profondes, mais qui suffisent à ouvrir une porte d'entrée sur l'organisme. Il est naturel, en ce cas, que la sécheresse augmente le nombre des cas.

V

Dans ces champs si voisins du fondoir que les bêtes mortes y sont de suite transportées, comment se fait l'infection du sol ?

Il est évident que l'urine et les déjections des animaux malades y répandent un grand nombre de germes. Mais ce mode de souillure n'est pas le seul ; ce n'est peut-être même pas le plus important.

Dès qu'une bête malade se couche, les vautours arrivent en foule et font cercle autour d'elle, approchant de plus en plus à mesure que les mouvements agoniques diminuent. Aussitôt que l'animal ne remue plus, ils se précipitent à la curée.

En arrivant sur le pâturage le matin, nous avons assisté au plus curieux des spectacles. Une nuée d'urubus se disputaient autour du cadavre, et ne fuyaient même pas à notre arrivée. Les uns s'attaquaient aux yeux, d'autres à la langue. Un de ces rapaces, plongeant la tête et le cou par l'anus, allait jusque dans l'abdomen chercher des morceaux d'organes. Plusieurs autres, autour de lui, attendaient pour prendre sa place qu'il ait retiré sa tête pour respirer.

Ils ne s'enfuirent qu'à regret à notre approche, sans s'éloigner beaucoup. Les yeux, la langue avaient disparu. A l'ouverture du cadavre, nous avons constaté que la vessie et une grande partie de l'intestin manquaient déjà, et cependant le corps était encore chaud. La peau n'était pas entamée, mais elle n'eût pas tardé à

l'être si l'animal était resté plus longtemps. Les urubus sont si nombreux et si voraces qu'au dire des bouviers, en moins d'une journée ils réduisent un bœuf à l'état de squelette. Au fondoir ils surveillent le dépeçage et profitent de la moindre inattention des ouvriers pour venir enlever des lambeaux de chair. Du reste on leur jette souvent la rate. Une rate de bœuf pesant plus de 20 kilos disparaît en quelques secondes, absorbée par la nuée d'oiseaux qui se précipitent dessus en masse compacte. L'audace de ces rapaces est d'autant plus grande qu'ils sont, au Brésil, protégés par une ordonnance préfectorale qui défend de les tuer.

Nous nous sommes demandés si ces vautours qui avalent tant de bactéridies, n'étaient pas capables de disséminer les spores charbonneuses avec leurs déjections.

A un urubu, gardé au laboratoire, nous avons fait manger un cobaye charbonneux. Les matières fécales recueillies dans les 48 heures qui ont suivi le repas, délayées dans l'eau stérile et chauffées pendant 10 minutes à 90°, ont été ensemencées sur gélose. Très peu de microbes ont résisté à ce chauffage. Sur la gélose, nous avons obtenu des colonies séparées, parmi lesquelles un grand nombre de colonies pures de charbon. Une d'entre elles ensemencée en bouillon et inoculée à un cobaye (1/4 c.c.) l'a fait mourir en 48 heures avec les signes caractéristiques de l'infection charbonneuse.

Quand on songe que les vautours de Santa-Cruz et ceux de Rio ne forment qu'une seule et grande compagnie qui se rassemble presque tous les soirs, à une certaine saison de l'année, pour gagner les montagnes; quand on songe au vol puissant de ces rapaces qui peuvent se déplacer de plus de 90 kilomètres en une journée, on comprend facilement le rôle considérable qu'ils jouent dans la dispersion des spores. C'est à cause d'eux que l'on trouve du charbon dans toutes les plaines qui avoisinent la baie de Rio, et dans lesquelles le bétail est cependant assez rare.

CONCLUSIONS

La Garotilha est une infection charbonneuse.

Les vautours sont les principaux agents de dispersion de la maladie.

Le Gérant : G. Masson.

Sceaux. — Imprimerie Charaire.

17me ANNÉE SEPTEMBRE 1903 N° 9

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

LA SPIRILLOSE DES POULES

PAR LES Drs E. MARCHOUX ET A. SALIMBENI

I

Dans la ville de Rio de Janeiro et dans les environs, il y a sur les poules, dont l'élevage est très répandu, une maladie qui sévit avec une extrême violence [1]. Il n'est pas rare de voir disparaître en quelques jours tout un poulailler se composant quelquefois de plus de 100 poules. Les animaux de race sont plus fréquemment et plus sévèrement atteints que ceux des espèces communes.

Avant tout autre symptôme, la poule malade présente de la diarrhée, puis elle laisse la nourriture, reste somnolente, les plumes hérissées, la crête pâle. Elle ne perche plus. Quand l'état s'aggrave, elle se couche; la tête, qu'elle n'a plus la force de relever ou de cacher sous l'aile, repose sur le sol. Enfin, la mort survient brusquement dans un spasme.

Quelquefois la maladie prend la forme chronique, et l'animal, après un semblant de retour à la santé, redevient triste et reste couché sur le sol, avec de la paralysie des pattes.

Quelques jours plus tard la paralysie gagne les ailes, la poule maigrit considérablement et meurt cachectique en 8 ou 15 jours.

D'autre fois la poule guérit complètement après la première

1. Nous devons à l'obligeance de M. le Dr Ferrari, médecin adjoint à l'hôpital Saint-Sébastien, d'avoir pu nous procurer des animaux malades. Nous tenons à le remercier ici de son aimable entremise, en même temps que de sa complaisance à nous fournir tous les renseignements dont nous avons eu besoin.

période, plus rarement la guérison se produit après une atteinte de paralysie.

La température suit une marche caractéristique. Dès le début de la maladie, le thermomètre indique 42°-43°. Pendant toute la durée de la première période, c'est-à-dire pendant 4 ou 5 jours, la température reste élevée, puis elle baisse au-dessous de 41°, pour revenir bientôt à la normale si la poule guérit. Elle reste basse si l'animal se cachectise. La mort survient en hypothermie.

Quand on fait l'autopsie d'une poule morte dans la période aiguë, on constate que la rate a triplé de volume. Le foie, fortement augmenté, présente de la dégénérescence graisseuse plus ou moins accentuée; parfois on observe de petits foyers de nécrose de place en place. Les autres organes ne paraissent pas sérieusement lésés. Le péricarde contient souvent un caillot de fibrine. Le sang du cœur reste fluide, couleur lie de vin.

Si on examine pendant la première période le sang d'une poule atteinte de cette maladie, on y trouve des spirilles en quantité plus ou moins grande, suivant l'état de la bête malade. Ensemencés sur les milieux ordinaires de laboratoire, le sang et la pulpe des divers organes ne donnent lieu à aucune culture.

Quand, à une poule saine, on injecte sous la peau quelques gouttes de sang d'une poule malade, au moment où celui-ci renferme des spirilles, on reproduit, chez l'animal inoculé, la même maladie avec tous ses caractères. Dans son sang, on retrouve le même spirille.

La maladie est donc une spirillose.

II

On connaît déjà deux maladies causées par des spirilles, la fièvre récurrente de l'homme, produite par le spirille d'Obermeyer, et la spirillose des oies découverte par Sakharoff[1]. D'après les recherches de Sakharoff, de Gabritchewsky et de Cantacuzène, la spirillose des oies n'est pas transmissible à la poule. Cantacuzène n'a réussi à infecter que de jeunes poussins, qui sont morts avec un nombre considérable de spirilles dans le sang.

Quand on injecte du sang chargé de spirilles, soit sous la

1. Au moment où ce mémoire fut écrit (janvier 1903), nous n'en connaissions que deux. Depuis, M. Laveran en a signalé une troisième qui sévit sur les bovidés. *Sur la spirillose des bovidés*. C. R. 1903, n° 16. 20 avril, p. 939.

peau, soit dans les muscles ou dans le péritoine d'une poule saine, voici quel est le tableau de la maladie.

Déjà quelques heures après l'inoculation, la température dépasse 42°. Le lendemain, l'animal a de la diarrhée, il est triste et ne mange pas : la température avoisine ou dépasse 43°. Au bout de 24 heures, on constate déjà dans le sang la présence de spirilles en petit nombre. Il n'y a aucune réaction au point d'inoculation.

La température reste au voisinage de 43° pendant encore 3 ou 4 jours, puis elle tombe au-dessous de 41° et quelquefois de 40.

Les spirilles ont été constamment en augmentant. Leur nombre peut arriver à être considérable. La température a déjà baissé quand la quantité de parasites est arrivée à son maximum.

D'abord isolés, ils se réunissent ensuite en petits amas assez lâches, qu'on trouve disséminés dans toute la préparation. Ces petits amas se réunissent ensuite en groupes très serrés et très volumineux, qui sont rejetés par le frottis à l'extrémité de la lame de sang.

Tant que les spirilles sont isolés, ils sont très mobiles, rigides et s'avancent rapidement en tournant autour de leur axe, avec un mouvement en tire-bouchon. Dès qu'ils commencent à former des amas, leur mouvement de progression est plus lent; ils s'infléchissent à droite et à gauche comme une lanière de fouet; ils se recroquevillent, se retournent sur eux-mêmes de façon à prendre des formes en 0 ou en 8 de chiffres. Puis ils s'enlacent, s'enchevêtrent les uns dans les autres, et n'ont plus que des mouvements lents et peu énergiques.

La crise apparaît peu de temps après que les gros amas se sont formés. Dans les formes aiguës, elle précède de très peu la mort qui survient même quelquefois au moment des gros amas.

Si l'animal doit guérir, l'état général s'améliore : le poids, qui depuis le début de la maladie a baissé très rapidement, s'arrête dans sa descente; la température se relève et la santé parfaite ne tarde pas à revenir. Cependant ce n'est qu'au bout de 12 à 15 jours que la poule a repris son poids primitif.

Quand la maladie prend la forme chronique, le poids continue à baisser, la température reste au-dessous de la normale, la paralysie survient et bientôt la mort. Cette période peut durer de 12 à 15 jours.

A l'autopsie, on trouve tous les organes atrophiés, même le foie et la rate.

Si l'animal paralysé guérit, la santé revient très lentement et péniblement.

Presque jamais nous n'avons trouvé une jeune poule absoument réfractaire.

III

Quand les poules meurent dans un poulailler de cette spirillose, les autres volatiles qui vivent avec elles ne sont pas épargnés.

Nous avons pu nous assurer que les jeunes poussins prennent très facilement la maladie par inoculation. Les phénomènes sont les mêmes que chez les jeunes poulets ou chez les poules adultes.

Cependant l'état général semble meilleur; jusqu'au jour de la mort le poussin répond à l'appel de sa mère et vient picorer la nourriture qu'elle lui offre.

L'oie est très sensible au spirille de la poule. Elle meurt en 5 ou 6 jours avec tous les signes d'une infection grave. Les spirilles sont très nombreux dans son sang.

Le canard et la pintade prennent aussi la spirillose.

Le pigeon, par inoculation de sang infecté, présente pendant quelque temps une petite élévation de température et un peu de tristesse, mais on ne trouve jamais de spirilles dans son sang.

La tourterelle et le moineau prennent cependant très facilement la spirillose et en meurent.

Le cobaye paraît insensible à l'inoculation de sang de poule infectée, quelle que soit la quantité injectée. Quelquefois cependant, il se forme une eschare au point de l'injection.

Nous avons essayé d'infecter, avec le spirille de la poule, le singe de l'ancien continent, qui prend le spirille de la fièvre récurrente.

Deux singes infectés se sont montrés réfractaires. L'un d'eux cependant a présenté au point d'inoculation un volumineux œdème qui a persisté pendant 2 jours, mais dans lequel nous n'avons jamais trouvé de spirilles.

IV

Par inoculation de sang infecté à une poule neuve, on provoque toujours la maladie et le développement de nombreux spirilles dans son sang. Le sérum fraîchement recueilli jouit de la même propriété.

Dans ce sérum les spirilles s'agglutinent très rapidement; dès qu'il est séparé du caillot, il renferme déjà de gros grumeaux. Au bout de 24 heures tous les spirilles sont réunis au fond du tube, mais on perçoit très nettement des mouvements chez ceux qui sont à la périphérie des amas. A ce moment le sérum est encore capable de transmettre la spirillose.

Au bout de 48 heures, tout mouvement a cessé et le sérum n'est plus pathogène. Mais si quelques jours plus tard on essaye d'infecter avec du sang frais la poule qui a reçu ce sérum de 48 heures, on constate qu'elle est devenue réfractaire.

Après 4 jours de conservation au laboratoire, le sérum possède le même pouvoir immunisant. Il en est de même lorsqu'au lieu de le garder à la température de la chambre, on l'a maintenu pendant le même temps à l'étuve à 37°.

Mais si au lieu d'être soumis à cette température de 37°, le sérum frais et chargé de spirilles est porté à 55°, on constate qu'un chauffage de 5 minutes dans de petites ampoules suffit à détruire son pouvoir infectant.

La poule qui a reçu ce sérum chauffé non seulement ne contracte pas la spirillose, mais quelques jours plus tard elle se montre réfractaire à une inoculation virulente qui tue la poule témoin.

Un chauffage de 10 minutes donne les mêmes résultats. Mais lorsque cette température de 55° est maintenue pendant 20 minutes, on constate que le sérum a perdu son pouvoir vaccinant.

La poule qui le reçoit, quand on l'inocule quelques jours plus tard, prend la spirillose en même temps que le témoin et d'une manière aussi grave.

Le sérum conservé de 48 heures à 4 jours, le sérum chauffé à 55° de 5 à 10 minutes possèdent donc des propriétés vaccinantes. Ce pouvoir est-il dû à une atténuation du microbe qui, lorsqu'il est tué par un chauffage de 20 minutes à 55°, perdrait ses facultés? Ou bien existe-t-il dans le sérum des substances toxiques, que

détruit une température de 55° maintenu pendant 20 minutes?

Pour élucider cette question, nous avons institué les expériences suivantes :

Des spirilles conservés 3 jours au laboratoire sont séparés du sérum qui les contient, lavés à l'eau physiologique stérile et injectés. La poule qui les reçoit, inoculée quelques jours plus tard avec du sang virulent, ne prend pas la maladie.

D'autre part, nous avons saigné une poule en pleine infection. Nous avons séparé le sérum qui renfermait de nombreux spirilles, nous l'avons étendu de 9 fois son volume d'eau physiologique stérile, et nous avons fait passer le tout au filtre Berkefeld. Le liquide filtré était clair, limpide, et il était impossible d'y rencontrer le moindre spirille malgré des examens répétés.

Disons de suite qu'une poule témoin, qui avait reçu 5 c. c. du mélange avant filtration, a pris la spirillose dans le temps ordinaire et est morte en 7 jours.

Celle qui a reçu 20 c. c. du filtrat non seulement n'a présenté aucun symptôme de maladie, mais encore elle s'est montrée réfractaire à une injection virulente faite 17 jours après.

Lorsque le filtrat a été chauffé pendant 1/4 d'heure à 55°, la poule injectée ne présente pas de spirilles dans le sang quand on l'inocule ensuite avec du sang virulent. Elle meurt cependant cachectique en une quinzaine de jours.

Ainsi donc l'immunité des poules qui ont reçu le sérum conservé ou le sérum chauffé est due à des causes multiples. Sans doute les microbes atténués jouent un grand rôle, mais les substances répandues dans le sérum ont une action qui est loin d'être négligeable. Si un chauffage de 5 minutes à 55°, si le maintien du sérum à la température de la chambre pendant 48 heures suffisent à tuer les microbes, ce que nous n'avons pu encore déterminer, les substances dissoutes sont peut-être les seules à intervenir dans la vaccination. Nous voyons, en effet, qu'un chauffage de ces substances à 55° pendant 1/4 d'heure, s'il ne suffit pas à les détruire, les altère néanmoins beaucoup. Dans un second mémoire, nous nous proposons de reprendre ces importantes questions, pour essayer de les élucider complètement.

V

Après la crise, les spirilles disparaissent de la circulation et

ne s'y montrent plus. Jamais nous n'avons observé un nouvel accès. La poule peut se cachectiser et mourir sans que les spirilles reparaissent dans le sang.

Une poule guérie possède une immunité absolue et cette immunité s'établit de très bonne heure. Même par inoculation au moment de la crise, la poule se montre réfractaire à toute nouvelle infection.

Comment s'établit cette crise, quel est son mécanisme biologique et celui de l'immunité qui s'ensuit, ce sont là autant de questions que le manque de temps nous a empêché de résoudre et que nous comptons reprendre plus tard.

Néanmoins nous avons pu nous assurer que le sérum des poules immunisées, même quand elles n'avaient reçu qu'une inoculation virulente, possédait des propriétés préventives.

2 c. c. de sérum d'une poule guérie de la spirillose depuis 1 mois, donnés 48 heures avant l'injection virulente à un poulet de 550 grammes, le protègent absolument. Il n'y a eu ni élévation de température ni baisse de poids. 14 jours plus tard, ce même poulet, qui pesait alors 600 grammes, est inoculé de nouveau avec quelques gouttes de sang infecté. Le lendemain, la température monte à 43°, mais le surlendemain tout est rentré dans l'ordre. Le poids, après avoir fléchi jusqu'à 560 grammes, est au bout de 9 jours à 575 grammes et en voie de progression.

Ainsi non seulement une injection préventive de sérum de poule immunisée est capable de protéger contre une injection virulente qui tue le témoin, mais encore l'animal est vacciné contre une nouvelle injection.

Une 2e expérience faite dans les mêmes conditions, nous a donné les mêmes résultats.

Quand on fait un mélange à parties égales du sérum de poule immunisée et de sérum chargé de spirilles, et qu'on l'injecte, après 5 minutes de contact la prévention est complète. Cependant une de nos poules, sans jamais avoir de spirilles dans le sang, a eu une température élevée pendant quelques jours. Son poids a baissé graduellement et continuellement, puis elle a fini par mourir cachectique.

Le témoin était mort en 5 jours.

Les autres ont résisté, non seulement à l'inoculation du mélange sans présenter de phénomènes morbides, mais encore

elles se sont montrées réfractaires à une nouvelle inoculation virulente.

Si le sérum de poule immunisée a un pouvoir nettement préventif, il ne présente pas la moindre action thérapeutique, au moins dans les conditions où nous nous sommes placés.

Les poules qui nous ont fourni le sérum, n'avaient pas été chargées; elles avaient reçu seulement 2 injections de quelques gouttes de sang virulent. Leur sérum donné 24 heures après le sang infecté, au moment où les spirilles commençaient à apparaître dans la circulation, n'a pas empêché le nombre des parasites de croître et n'a eu aucune action sur la marche de la maladie qui a évolué comme chez le témoin.

VI

Le sérum des poules immunisées a sur les spirilles un pouvoir agglutinant et immobilisant, comme le montrent les 2 expériences suivantes.

A la poule 39 qui a beaucoup de spirilles très mobiles, nous retirons 10 c. c. de sang que nous laissons coaguler. Le sérum recueilli renferme des grumeaux et des spirilles mobiles et isolés. Nous laissons déposer les grumeaux et nous nous servons du sérum qui surnage.

L'expérience a été faite en goutte pendante. Les résultats en sont consignés dans le tableau suivant :

La poule 8 qui a fourni une partie du sérum agglutinant a résisté à 1 injection virulente. La poule 12 qui a donné l'autre partie a reçu 2 injections.

Résultat 1 h. après mélange.	Sérum 39.	Sérum 8.	Sérum 12.	Eau phy.	Eau distillée
Comme au moment de la prise.	+				
Immobilisation complète.	+	+			
Id.	+		+		
Comme au moment de la prise.	+			+	
Id.	+				+

Le signe + indique la nature des liquides employés.

Avec le sérum de la poule 41, nous avons renouvelé ces essais dans les même conditions. Les résultats en sont consignés dans le tableau suivant.

L'expérience est faite en tubes.

Résultat 1 h. après mélange.	Sang de fibrine.	Sérum 41.	Sérum 8.	Sérum 12.	Eau phy.	Eau distillée.
Sp. mobiles ou isolés.		+				
Agg. en gros amas immobiles.		+	+			
Id.		+		+		
Mobiles et isolés.		+			+	
Id.		+				+
Id.	+		+			
Immobilisation et agglutination.	+					
Id.	+			+		
Mobiles et isolés.	+				+	

Les sérums ont été mélangés à parties égales, de même qu'on a toujours employé la même quantité d'eau physiologique et d'eau distillée que de sérum.

Avec les sérums dont nous disposions, et qui ne peuvent être considérés comme doués de propriétés puissantes, nous n'avons observé, en dehors de l'immobilisation et de l'agglutination, aucun phénomène de dissolution ou de transformation en granules.

VII

Comment se fait l'infection naturelle chez les poules et comment la maladie peut-elle se répandre si vite dans tout un poulailler ? Il était intéressant de rechercher si un parasite des animaux de basse-cour, hôte intermédiaire du spirille, n'était pas capable de conserver et de transmettre les germes. Grâce à l'obligeance de M. le docteur Ferrari, nous avons pu visiter un certain nombre de poulaillers infectés. Dans tous nous avons trouvé, cachés sous les bois ou dissimulés dans l'interstice

des planches, des acariens de la famille des Argas. Ces acariens piquent les poules, et les spirilles se conservent vivants dans leur estomac pendant très longtemps.

Pour vérifier si ces acariens sont capables de transmettre la maladie, nous avons fait l'expérience suivante.

Dans un seau en verre, recouvert de toile métallique, nous avons mis une poule n° 1 avec des argas infectés, protégés par un disque de bois percé de trous.

Dans un deuxième seau, nous avons placé une poule neuve n° 2, une poule infectée et des argas non infectés.

Dans une caisse en bois, dont une paroi était en toile de laiton très fine, ont été mises une poule infectée et une poule n° 3.

La poule n° 1 a été infectée en 9 jours. La poule 2 n'a pas été malade, la poule 3 est tombée malade en 4 jours.

Ces résultats nous ont beaucoup surpris, mais à l'analyse nous en avons reconnu la signification.

La poule infectée qui vivait avec la poule 3 restait avec elle nuit et jour. Dans cette étroite captivité, la poule malade était devenue la victime de la poule saine. Elle avait les plumes arrachées et portait de nombreuses plaies saignantes sur le dos et sur les ailes. Nous avons pensé que la poule saine avait pu s'infecter par le tube digestif.

D'autre part, nous avons vérifié que la poule 2, qui s'était trouvée à la fois dans les conditions de la poule 1 et dans celles de la poule 3 sans prendre la maladie, avait l'immunité. Une injection sous-cutanée d'une forte dose de sang infecté ne l'a pas rendue malade.

Nous avons donc modifié les conditions d'expériences de la façon suivante :

1° Une poule neuve n° 4 a été placée dans le seau 1 avec des argas infectés, pendant la nuit seulement. De plus, pour éviter toute contamination par le tube digestif, si elle mangeait des argas, elle a été munie d'une muselière en fil de fer qui l'empêchait totalement d'ouvrir le bec. Pendant le jour elle était isolée dans une cage séparée ;

2° Une poule neuve n° 5 a été mise, muselée, dans le seau 2 avec des argas non infectés et une poule malade. Comme la poule n° 4, elle ne restait dans le cristallisoir que la nuit, et était isolée dans une cage séparée pendant le jour ;

3° Dans une caisse en bois, séparée en 2 compartiments par une toile métallique à larges mailles, nous avons mis d'un côté une poule neuve n° 6, de l'autre une poule infectée ;

4° A une poule neuve n° 7, nous avons fait manger du coton imbibé de sang infecté ;

5° Une poule neuve n° 8 a mangé des déjections fraîches d'une poule malade.

Les résultats ont été les suivants :

La poule 4 et la poule 5 ont pris la spirillose en 7 jours. La poule 7 l'a prise en 4 jours, la poule 8 en 5 jours. La poule 6 n'a pas été malade en 15 jours; cependant elle était sensible, puisqu'une injection virulente l'a rendue malade en 2 jours.

Cette expérience a été renouvelée plusieurs fois avec le même résultat.

Les argas sont donc bien capables de transmettre la spirillose, et ce sont eux qui dans l'infection naturelle la transmettent toujours, car on ne peut supposer que des spirilles qui se conservent si peu de temps, en dehors de l'organisme, soient facilement transmis avec les déjections des poules malades.

D'autre part, dans un poulailler de dimensions assez grandes, les poules malades peuvent s'isoler sans être les victimes des poules saines.

Pendant combien de temps les argas sont-ils capables de conserver leur pouvoir infectant? C'est une question qu'il nous est encore impossible de trancher. nous pouvons seulement dire qu'une série d'argas a pu infecter une poule neuve 5 mois après avoir piqué une poule malade. L'avenir nous permettra de dire s'ils sont capables de conserver les spirilles ou leurs germes pendant plus de temps encore.

Nous avons pu nous assurer qu'ils transmettent la spirillose plus sûrement et plus sévèrement que l'inoculation artificielle. Ces acariens, en effet, peuvent infecter le pigeon que nous n'avons pu rendre malade par inoculation. Deux pigeons exposés à leur piqûre ont ainsi présenté des spirilles dans le sang au bout de 7 jours et sont morts des suites de la maladie.

Depuis longtemps on pense que la punaise transmet la fièvre récurrente; on sait, en effet, que le spirille d'Obermeyer se conserve pendant plus de 100 jours dans le tube digestif de cet insecte. Il serait intéressant de vérifier si dans les pays où

existe l'*Argas Persicus*, cet acarien, qui passe pour être si dangereux quand il pique les enfants et les étrangers, n'est pas, lui aussi, un agent de transport pour la fièvre récurrente.

CONCLUSIONS

1° La maladie que nous avons observée à Rio de Janeiro sur les poules est causée par un spirille :

2° La maladie est transmissible par inoculation de sang infecté ;

3° Elle l'est aussi par le tube digestif quand on fait manger du sang chargé de spirilles ou des déjections de poules malades ;

4° Dans l'infection naturelle, ce sont les argas qui transmettent la maladie. Ils conservent le virus ;

5° En dehors de l'organisme, dans le sang, le suc des organes et les déjections, les spirilles ont perdu toute virulence au bout de 48 heures ;

6° La vaccination, toujours, à coup sûr, conférée par une première atteinte, peut être obtenue par injection de sang et de sérum virulent conservés de 48 heures à 4 jours ou chauffés à 55° de 5 à 10 minutes, par le sérum de poule malade, fraîchement recueilli et filtré sur Berkefeld ;

7° Le sérum des animaux guéris d'une première atteinte possède des propriétés nettement préventives ;

8° *In vitro*, le même sérum a une action agglutinante et immobilisante très marquée.

Emploi de la bombe calorimétrique de M. Berthelot

pour démontrer l'existence de l'arsenic dans l'organisme.

Par M. GABRIEL BERTRAND.

Dans un mémoire paru il y a peu de temps[1], j'ai réussi à expliquer les contradictions qui se sont élevées entre les chimistes, nombreux et habiles, qui se sont occupés de la question de l'arsenic normal, et j'ai montré que, jusque-là, aucune de leurs expériences, du moins sous la forme où elles ont été publiées, ne fournissait de preuves définitives, ni de l'absence, ni de l'existence de ce métalloïde chez les animaux et les plantes.

Les quantités d'arsenic qui existent à l'état normal dans les tissus sont, en général, trop petites pour qu'on ait pu les découvrir avec les méthodes alors en usage. Par contre, on ne connaissait pas les procédés de purification des réactifs que j'ai indiqués, et, inconsciemment, on introduisait toujours des traces d'arsenic au cours des expériences.

Si on opérait, par exemple, sur un organe facile à détruire, muscle, foie, sang, etc., on employait peu de réactifs et l'arsenic introduit, joint à l'arsenic normal, pouvait être en quantité trop faible pour être reconnaissable : on concluait alors à l'absence de l'arsenic. Si au contraire, on examinait un organe résistant beaucoup à la destruction, tel que la glande thyroïde, on était obligé de prendre une plus forte quantité de réactifs ; l'impureté s'accumulait dans le résidu de l'attaque, et il arrivait un moment où, le degré de sensibilité de la méthode de recherche étant atteint, on voyait apparaître de l'arsenic. Celui-ci était déclaré normal, bien qu'il ne représentât, en général, qu'une partie du métalloïde apporté par les réactifs.

Naturellement, plus la destruction avait été difficile, plus on trouvait de métalloïde; les résultats quantitatifs eux-mêmes dépendaient beaucoup plus des conditions expérimentales que de l'existence possible de l'arsenic dans les tissus examinés.

1. Sur la recherche et sur la preuve de l'existence de l'arsenic chez les animaux, *Annales de chimie et de physique*, 7ᵉ série, t. XXVIII, p. 242-275, 1903.

C'est en perfectionnant la méthode classique de Marsh, au point de pouvoir déceler aisément un demi-millième de milligramme d'arsenic, et en trouvant des procédés de purification des réactifs qui permissent d'utiliser, avec certitude, une méthode aussi sensible, que j'ai rendu possible une bonne démonstration de l'existence normale de l'arsenic dans l'organisme.

D'assez nombreuses expériences, sur des matériaux bien choisis, m'ont alors obligé d'admettre que l'arsenic existe vraiment à l'état normal chez les animaux et les plantes, et qu'il se rencontre, sans doute au même titre que l'azote, le soufre et la phosphore, dans tous les tissus de l'organisme[1]. D'après ces expériences, les poils, les ongles, les cornes et, en général, les tissus kératiniques sont les plus riches de tous; la glande thyroïde, contrairement aux résultats obtenus par M. Arm. Gautier, est parmi les plus pauvres.

Néanmoins, j'ai cru nécessaire de trouver une méthode de démonstration plus précise encore que celle dont je me suis servi. Or, toutes les difficultés actuelles résident dans la destruction, d'ailleurs incomplète, des matières organiques, destruction qui entraîne l'emploi de quantités notables d'acides sulfurique et nitrique, puis de gaz sulfureux, d'hydrogène sulfuré, d'ammoniaque, sans compter l'usage d'objets en verre, de papier à filtrer, etc. J'ai pensé qu'on arriverait peut-être au but désiré en brûlant, d'une manière intégrale, la substance organique sèche dans un vase clos, tout en platine, en présence d'oxygène pur.

M. Berthelot avait déjà proposé, et mis en pratique, l'emploi de sa bombe calorimétrique pour le dosage des divers corps simples contenus dans les composés organiques[2], et M. A. Valeur avait utilisé cette méthode, légèrement modifiée, pour la détermination quantitative du chlore, du brome et de l'iode dans les mêmes composés[3].

J'ai essayé si des organes secs, d'origine animale ou végétale subiraient, malgré leur structure et leur richesse en sels alcalins, une combustion aussi complète que des composés organi-

1. *Bulletin de la Soc. chim.* 3e série, p. 1233-1236 (1902), et *Annales de l'Inst. Pasteur*, t. XVII, p. 1-10 (1903).
2. *Comptes rendus, Ac. d. Sc.*, t. CXXIX, p. 1002-1005, 1899.
3. *Comptes rendus, Ac. d. Sc.*, t. CXXIX, p. 1265-1266, 1899.

ques définis, et si, après cette combustion, on retrouverait les traces d'arsenic qui pouvaient y être contenues. Le succès de mes expériences a été si complet[1] que je considère aujourd'hui l'emploi de la bombe de M. Berthelot comme absolument indiqué dans tous les cas où il s'agira de la recherche et du dosage de très petites quantités d'un élément quelconque contenu dans un organe.

L'allumage de la substance ne peut être fait à l'aide du fil de fer, à cause de l'arsenic qui est toujours présent dans ce métal. Il faut employer un fil de platine, fil dans la boucle duquel on place, suivant un artifice déjà indiqué par M. Berthelot, une petite mèche de fulmicoton. Mais ici, une précaution s'impose: celle d'employer du fulmicoton préparé avec des acides absolument purs. Le fulmicoton ordinaire renferme des traces appréciables d'arsenic.

La capsule, dans laquelle je place la substance divisée en petits morceaux et desséchée, est assez grande et tout à fait plate; son diamètre atteint 40 millimètres et sa profondeur seulement 5 millimètres.

La pression de l'oxygène, préparé par électrolyse de l'eau en présence de soude, n'a pas besoin d'être aussi grande que dans les déterminations calorimétriques. Peu importe, en effet, qu'il reste une certaine quantité d'oxyde de carbone dans la bombe : il suffit que la matière organique disparaisse entièrement à l'état gazeux.

Après la combustion et le refroidissement, on attend encore quelques minutes, afin que les dernières particules, solides ou liquides, en suspension dans l'atmosphère de la bombe soient tout à fait déposées. S'il est nécessaire, on accumule dans la bombe le produit de plusieurs combustions.

Lorsque celles-ci sont terminées, on transvase le contenu de la bombe dans une capsule de porcelaine, en se servant d'une pipette. On rince avec un peu d'eau, qu'on joint au liquide principal, et on évapore à sec au bain-marie, pour chasser l'acide azotique dû à la combustion partielle de l'azote [2]. Le liquide contenu

1. Ces expériences ont été exécutées dans le laboratoire de chimie agricole de Meudon, grâce à l'obligeance de M. Berthelot.

2. Les tissus organiques renfermant des chlorures, il se fait un peu d'eau régale : si on évaporait dans une capsule de platine, celle-ci serait attaquée.

Pour la même raison, on peut craindre la perte d'une petite partie de l'arsenic

dans la bombe est toujours acide, même quand on opère sur des tissus qui, brûlés à l'air, donneraient des cendres fortement alcalines, par exemple le blanc d'œuf. Il s'ensuit que le résidu de l'évaporation contient généralement des nitrates. On le reprend par quelques gouttes d'acide sulfurique pur; on évapore de nouveau, avec précaution, jusqu'à production de fumées blanches; enfin, après refroidissement, on ajoute un peu d'eau distillée et on introduit directement la solution dans l'appareil de Marsh.

Après chaque opération, la bombe est lavée à l'acide azotique chaud, puis à l'eau distillée.

Dans les expériences que j'ai faites, je me suis toujours assuré, avant d'examiner une nouvelle substance, de la propreté absolue de la bombe, en effectuant une combustion d'essai avec du camphre. Je dois dire qu'aucune de ces combustions d'essai n'a jamais donné la plus petite trace d'arsenic [1].

Voici maintemant le détail d'une série caractéristique de ces expériences.

A. *Expériences de contrôle.*

1° *Camphre.* On brûle, en 3 fois, sous 30 atmosphères d'oxygène, un poids total de $3^{gr},70$ de camphre ;

2° *Saccharose.* On brûle, en 2 fois, sous 30 atmosphères de pression, $3^{gr},04$ de saccharose cristallisé dans l'alcool.

Résultat : Absence complète d'arsenic ;

3° *Sucre ordinaire.* On brûle, en 2 fois, sous 30 atmosphères, $2^{gr},50$ de sucre ordinaire du commerce.

Résultat : trace arsenicale à peine visible, seulement sur un fond noir.

B. *Limite de sensibilité.*

1° On brûle en une seule fois, sous 30 atmosphères, $1^{gr},05$ de saccharose pur, additionné de $0^{mgr},001$ d'arsenic. On avait

à l'état de chlorure, au cours de l'évaporation. Si on voulait faire un dosage précis, il faudrait donc, au lieu d'évaporer, traiter la solution acide par l'hydrogène sulfuré. Pour le moment, je préfère suivre une technique plus simple, car j'ai surtout en vue une démonstration d'ordre qualitatif. Les résultats qu'elle donne ne sont que plus probants.

1. Avec les modifications que je lui ai fait subir, la méthode de Marsh donne un anneau, et un anneau très net, avec un demi-millième de milligramme d'arsenic; mais ce n'est pas là sa limite de sensibilité : on perçoit encore un enduit faible, grisâtre, plus visible sur un fond noir que sur un fond blanc, avec des quantités moindres, peut-être 1/5e de millième de milligramme.

préparé une solution d'arséniate de sodium dont 2 gouttes, versées avec une pipette contrôlée à la balance, contenaient exactement le poids de métalloïde indiqué. Ces 2 gouttes avaient été évaporées, l'une après l'autre, sur le bloc de sucre.

Résultat : anneau très net, voisin d'un 1/1000e de milligramme ;

2° On brûle un bloc de camphre pesant 1gr,28, dans une cupule dans laquelle on a évaporé 1 goutte de la solution titrée d'arséniate de sodium correspondant à 0mgr,0005 d'arsenic. Pression : 30 atmosphères.

Résultat : anneau net voisin de 1/2 millième de milligramme.

Ainsi, on ne trouve pas trace d'arsenic quand on brûle une substance organique pure; on peut retrouver nettement une quantité d'arsenic aussi petite que 1/2 millième de milligramme, quand on l'ajoute préalablement à cette même matière organique[1].

C. Arsenic normal.

1° *Écaille de tortue de mer.* La même qui a servi dans mes recherches antérieures. Elle provenait d'un animal capturé au cours d'une croisière scientifique organisée par S. A. S. le prince de Monaco, et présentait, au point de vue qui nous occupe, toutes les garanties[2].

On a brûlé, en trois fois, 5gr,29 de cette écaille. Pression de l'oxygène : 30 atmosphères.

Résultat : anneau très net, d'environ 0mgr,0015;

2° *Éponge.* Provenait aussi de la même croisière. On en a brûlé, en trois fois, 4gr,80. Même pression de l'oxygène.

Résultat : anneau très net, d'environ 0mgr,0015;

3° *Peau de germon.* Toujours de la même origine. Le poids de matière brûlée, en trois fois, a atteint 6 grammes;

Résultat : Bel anneau de 0mgr,002 environ;

4° *Blanc d'œuf.* Les œufs avaient été achetés à Paris et les blancs séchés à froid, dans le vide, sur l'acide sulfurique. On a fait deux expériences : la première, sur 4gr,97, en trois combustions, et la seconde, sur 5gr,18, aussi en trois combustions.

1. La bombe en platine donne seule des résultats exacts; avec les bombes émaillées, on introduit toujours des traces d'arsenic.

2. Voir le mémoire des *Ann. de l'Inst. Pasteur*, t. XVII, p. 1-10, 1903.

Résultats : La première expérience a donné un anneau faible, mais très net, de $0^{mgr},0005$ environ; on n'a rien obtenu dans la seconde.

5° *Glande thyroïde*. Une glande thyroïde, provenant d'une génisse de 18 mois élevée à l'École d'Alfort dans des conditions de garantie complète [1] et pesant $1^{gr},79$ après dessiccation, a été brûlée, en une seule fois, sous 25 atmosphères de pression.

Résultat : trace arsenicale presque invisible, perceptible seulement sur un fond noir.

Ainsi, après destruction à la bombe, et grâce à la méthode extraordinairement sensible de recherches que j'ai décrite, quelques grammes de tissu animal suffisent à donner des anneaux d'arsenic très nets. Les tissus de nature kératinique, comme l'écaille de tortue, l'éponge [2] ou la peau de germon donnent facilement des résultats mesurables : les autres, comme le blanc d'œuf et la glande thyroïde, donnent les anneaux les plus faibles.

Ces résultats, d'une méthode très simple et très précise, vérifient ceux que j'avais déjà publiés et lèvent tous les doutes concernant l'existence normale de l'arsenic dans l'organisme.

1. La même génisse dans les organes (foie, peau, cornes, poils, ongles) de laquelle j'avais déjà reconnu l'existence de l'arsenic. *Ann. Inst. Pasteur*, t. XVI, p. 553-561, 1902.

2. La recherche de l'arsenic dans l'écaille de tortue et dans l'éponge a été faite deux fois avec des résultats identiques.

SUR LA PRODUCTION DE LA MANNITE

par les ferments des maladies des vins.

PAR MM. P. MAZÉ ET A. PERRIER.

Les vins, on le sait, sont suceptibles d'être envahis par un grand nombre de ferments de maladies. C'est le sort réservé, le plus souvent, aux vins médiocres, ou bien à ceux qui ont subi une fermentation défectueuse. Les espèces bactériennes capables de se développer dans ces vins sont très faciles à obtenir à l'état de pureté ; ce sont pour la plupart des bactéries communes apportées par la terre qui souille les raisins, ou répandues à la surface des récipients mal nettoyés dans lesquels on reçoit le vin.

Les produits de bons crus, capables, en apparence, de se conserver longtemps, ne sont pas toujours, non plus, à l'abri des invasions microbiennes. Ils peuvent « tourner » comme les vins médiocres, ou bien prendre de « l'amertume » après un certain nombre d'années de bouteille.

Les ferments qui provoquent l'altération de ces vins ont fait l'objet d'un grand nombre d'études; ils ont été très bien observés et décrits par Pasteur ; mais jusqu'ici on ne les a pas cultivés à l'état de pureté.

L'un de nous a eu l'occasion, grâce à l'obligeance de M. Viala, notre ancien maître à l'Institut agronomique, de cultiver et d'isoler les microbes des vins tournés, amers et filants.

Tous présentent, dans les milieux artificiels, des caractères qui rappellent assez exactement ceux qu'ils possèdent dans les vins.

Tous, aussi, produisent de la mannite en présence de lévulose ; un seul, un coccus à grains inégaux réunis le plus souvent en groupe de deux ou de quatre, isolé d'un vin de Champagne, ne donne pas naissance à ce composé.

La propriété si répandue dans ce groupe de microbes, de

produire de la mannite, nous a conduits à étudier sa formation.

Nous nous sommes servis, dans toutes les expériences que nous allons décrire, de bouillon de haricots sucré; tous ces ferments se développent très bien dans ce milieu, qui a d'ailleurs servi à les isoler. Comme espèce microbienne, nous avons accordé la préférence à un ferment isolé d'un vin tourné, qui s'est montré supérieur aux autres comme producteur de mannite. Chaque culture comprenait 1200 c. c. de bouillon neutre et sans carbonate de calcium, placés dans des ballons de 2 à 3 litres, capables de résister au vide; les ballons étaient munis de tubes manométriques capillaires de 1 mètre de hauteur, adaptés par un bouchon en caoutchouc à un petit réservoir en verre plein de mercure; celui-ci était muni d'un tube latéral recourbé en tube de dégagement, de façon à permettre au besoin de recueillir les gaz sous le mercure.

Tous les joints étaient noyés sous le mercure.

Chaque culture recevait 2 c. c. de semence, empruntée à une culture en pleine activité; on faisait alors le vide aussi complet que possible, à la température de 30°, par la pompe à mercure, et on exposait les ballons à la température de 30° pendant toute la durée de l'expérience.

Le bouillon de haricots renferme normalement un peu de sucre; la semence en apporte également de petites quantités; on en a tenu compte dans le bilan du sucre.

Le tableau I donne les résultats de 2 cultures, faites simultanément avec le même bouillon; l'une avait reçu 3 0/0 de glucose, l'autre 2,5 0/0 de lévulose.

TABLEAU I.

	Résultats enregistrés		Résultats rapportés à 100 gr. de sucre disparu.	
	Glucose.	Lévulose.	Glucose.	Lévulose.
	gr.	gr.	gr.	gr.
Sucre disparu.........	7.316	24.759	100,	100,
Acide carbonique.....	1.887	2.856	25.800	10.727
Alcool éthylique......	1.450	0.719	19.820	2,902
Acide acétique........	0.605	3.271	8,268	13,210
Acide lactique........	2,944	4.063	40.250	14,410
Mannite...............	»	13.680	0,000	55,252
Poids des microbes...	0.462	0,495	6,315	2,001
Durée des cultures....	22 jours.	16 jours.		
Totaux.....			100,453	100,502

Les chiffres inscrits dans ce tableau prouvent que l'on se trouve en présence de trois fermentations: une fermentation alcoolique, une fermentation acétique et une fermentation lactique; un quatrième produit apparaît en présence de lévulose, c'est la mannite.

On aurait pu s'attendre à voir figurer parmi eux la glycérine et l'acide succinique, qui sont les compagnons habituels de l'alcool; mais nous n'avons pu réussir à les caractériser d'une façon indiscutable, bien que nous ayons multiplié les procédés d'analyse et les opérations, que l'on a fait porter jusque sur 500 c. c. de liquide de culture. D'ailleurs, si on considère les deux dernières colonnes du tableau, on voit que l'on retrouve tout le sucre disparu; ce n'est pas une preuve qu'il n'y ait pas de glycérine et d'acide succinique: c'est un argument sérieux qui permet d'affirmer qu'il n'y en a que des traces tout au plus.

Les produits des fermentations, augmentés du poids des microbes, se totalisent avec un léger excédent sur le sucre transformé. Cela s'explique tout naturellement si l'on veut bien se rappeler que la part des matières azotées dans l'alimentation du ferment est loin d'être négligeable.

Tous ces composés, à part la mannite, sont faciles à caractériser et à doser d'une façon suffisamment précise, car l'absence de réaction initiale et l'omission de carbonate de calcium, conditions voulues, éloignent complètement toutes substances étrangères aux transformation dues au microbe.

L'acide carbonique a été mesuré dans un volumètre Schlœsing de 1949,5 c. c. de capacité à 15°; c'est le seul produit gazeux mis en liberté par la culture. L'extraction a été faite au moyen de la pompe à mercure.

Cette opération, quand elle est poussée aussi loin que possible, provoque une distillation qui entraîne les composés volatils. On les recueille par un lavage, à l'eau distillée, de la canalisation en verre sur le parcours de laquelle se produit la condensation. On distille avec cette eau les tampons de coton humectés, et le liquide recueilli est réuni à celui de la culture, qu'on ramène à un volume fixe : 1,250 c. c.

L'alcool a été évalué au moyen du compte-gouttes Duclaux. Pour cela, on distillait 300 à 500 c. c. de liquide de culture dans un réfrigérant ascendant de Schlœsing, après neutralisation

préalable, et on recueillait 25 ou 50 c. c. de liquide, en s'assurant, par la réaction du bichromate de potassium, qu'il ne passait plus d'alcool à la fin de la distillation. On avait ainsi une liqueur alcoolique dont la richesse dépassait toujours 1 0/0 d'alcool en volume, susceptible par conséquent d'être dosée avec une approximation suffisante au compte-gouttes.

L'acide acétique se déterminait par le procédé des distillations fractionnées; on a constaté qu'il était toujours pur de tout mélange avec d'autres acides volatils; pour se mettre à l'abri des perturbations introduites, surtout dans la 10e prise, par la présence d'une quantité sensible d'extraits, on distillait d'abord 220 c. c., préalablement privés d'alcool, à 160 c. c., dans un ballon de 500 c. c., et sur les 160 c. c. recueillis, on prélevait 110 c. c. qu'on redistillait dans un ballon de 250 c. c.; on obtenait ainsi des chiffres qui présentaient une concordance très satisfaisante avec ceux qui correspondent à l'acide acétique.

L'absence d'acide succinique ayant été constatée, toute l'acidité fixe est due à l'acide lactique, caractérisé par la forme des cristaux de lactate de zinc et par la production d'aldéhyde en présence de bioxyde de plomb (réaction de Denigès).

La mannite a été dosée par le procédé Müller, après élimination préalable du sucre restant, par fermentation et défécation au sous-acétate de plomb, suivie d'un traitement à l'hydrogène sulfuré.

L'anhydride carbonique provient de la fermentation alcoolique; si on calcule le rapport $\frac{\text{alcool}}{CO_2}$, on trouve 0,76, chiffre inférieur à 1,04 prévu par la théorie; il y a donc une autre source de gaz carbonique, ou bien de l'alcool a disparu dans des transformations ultérieures.

L'acide lactique est fourni év demment par la diastase lactique récemment mise en évidence par MM. Buchner et Meisenheimer; il se forme aux dépens du sucre suivant l'équation (1) :

$$C^6H^{12}O^6 = 3C^3H^6O^3 \quad (1).$$

On peut également assigner à l'acide acétique une origine diastasique; cette diastase, connue seulement par son mode d'action, produirait la dislocation suivante de la molécule de sucre (2) :

$$C^6H^{12}O^6 = 3C^2H^4O^2 \quad (2).$$

Mais on sait que l'acide acétique des fermentations se produit

suivant un autre processus en présence de l'air; il dérive de l'alcool par voie d'oxydation, conformément à la réaction représentée par l'équation (3) :

$$C^2H^6O + O^2 = C^2H^4O^2 + H^2O \quad (3).$$

Il n'est pas douteux, cependant, que cette interprétation doit être écartée, puisque le ferment ne dispose pas d'oxygène libre; mais en raison même du déficit d'alcool signalé plus haut, ce processus mérite d'être examiné attentivement, sous réserve d'une adaptation aux conditions de l'expérience.

Les ferments anaérobies empruntent généralement à l'eau l'oxygène dont ils ont besoin, indépendamment de celui que leur apportent les autres substances alimentaires qui leur sont offertes.

L'équation (4) est donc vraisemblable :

$$C^2H^6O + H^2O = C^2H^4O^2 + 2H^2 \quad (4).$$

Ou bien encore celle-ci :

$$C^6H^{12}O^6 + 2H^2O = 2C^2H^4O^2 + 4H^2 + 2CO^2 \quad (5).$$

Mais il n'y a pas d'hydrogène libre dans les produits gazeux de la fermentation; nous allons voir cet hydrogène se fixer sur le lévulose pour former la mannite.

La formation de ce corps est accompagnée de variations importantes dans l'alcool et l'acide acétique, si on met les quantités obtenues en regard de celles qui ont été fournies par le milieu glucosé. D'un autre côté, l'excédent d'anhydrique carbonique sur l'alcool est tellement élevé qu'il faut admettre une transformation active de l'alcool à mesure qu'il se produit. Si nous reprenons l'équation (4) et si nous admettons que l'hydrogène libéré se porte sur le lévulose pour en faire de la mannite, nous aurons immédiatement l'origine des modifications introduites dans la fermentation par la présence du lévulose. L'équation (4) ainsi remaniée devient :

$$C^2H^6O + 2C^6H^{12}O^6 + H^2O = C^2H^4O^2 + 2C^6H^{14}O^6 \quad (6).$$

Il n'y a plus dans ces conditions d'hydrogène libre; voyons donc, si les faits justifient cette interprétation.

Comme on le voit, elle conduit à regarder la mannite comme le produit d'une réaction dont le but serait surtout de former de l'acide acétique aux dépens de l'alcool; nous pouvons donc en vertu de cette équation, et connaissant la quantité de mannite fournie par la culture, déterminer la quantité d'alcool primiti-

vement formée, et aussi l'acide acétique dérivant du sucre suivant l'équation (2). Nous obtiendrons ainsi des chiffres qui, rapportés au sucre consommé déduction faite de la mannite, nous fourniront des résultats comparables à ceux que nous avons obtenus avec le glucose, si toutefois l'équation (6) traduit fidèlement les faits.

Il s'est formé 13,680 grammes de mannite; on en déduit, par le calcul, que 1,7304 gr. d'alcool ont été oxydés pour produire 2,257 gr. d'acide acétique; le ferment a donc fourni en tout 1,7304 + 0,7185 = 2,449 gr. d'alcool; 3,2708 — 2.267 = 1,0138 gr. d'acide acétique se sont formés directement par dislocation du lévulose suivant l'équation (2), comme on le verra plus loin.

En rectifiant de cette manière les chiffres de la colonne 2, tableau I, on obtient les résultats suivants :

TABLEAU II.

Sucre consommé : 24,7589 — 13,6800 =	11,0789	grammes.
CO^2 dégagé	2,856	—
Alcool	2,449	—
Acide acétique	1,0138	—
Acide lactique	4,063	—
Poids des microbes	0,4955	—

Pour faciliter les comparaisons, il suffit de ramener à 100 de sucre disparu les chiffres précédents et de placer en regard les chiffres fournis par la culture en milieu glucosé, tableau III.

TABLEAU III.

	Glucose.	Lévulose.
Sucre consommé	100	100
CO^2 dégagé	25,800	25,778
Alcool	19,820	22,104
Acide acétique	8,268	9,150
Acide lactique	40,250	36,672
Poids des microbes	6,315	4,472

On voit ainsi que les chiffres ne sont pas identiques; mais ils sont de même ordre de grandeur et se confondent, en somme, dans la limite des variations dues à la différence de durée des cultures. Cette concordance justifie l'équation (6) et confirme l'opinion formulée au sujet de la mannite, à savoir qu'elle constitue une substance accessoire dans une action microbienne dont le terme principal est l'acide acétique. Il y a donc là un mode de formation de l'acide acétique par voie d'oxydation en vie anaérobie, qui

est lié à la présence du lévulose libre, et la fermentation traduite par l'équation (3) correspond à une propriété physiologique du microbe qui ne se manifeste pas en présence du glucose.



Nous avons cultivé notre ferment en présence de sucre interverti à la concentration de 5 0/0. Voici les résultats observés.

TABLEAU IV.

	Culture n° 1.		Culture n° 2.	
Durée de l'expérience	13 jours.		18 jours.	
CO^2 dégagé	3,580	grammes.	3,706	grammes.
Alcool	1,635	—	1,465	—
Acide acétique	2,815	—	3,355	—
Acide lactique	3,053	—	3,706	—
Mannite	8,446	—	9,766	—
Poids des microbes	0,911	—	1,007	—

Ce que nous avons dit précédemment nous dispense ici de tout commentaire; la mannite se forme en abondance, en raison de la présence de lévulose libre; son apparition se signale encore par des variations dans les rapports de l'anhydride carbonique, de l'alcool et de l'acide acétique; ces résultats ne présentent rien d'imprévu.



Le mécanisme de la formation de la mannite, tel que nous l'avons admis, diffère de celui qui a été établi par M. Monoyer[1] et par MM. Gayon et Dubourg[2].

Ces savants ont admis en effet, que l'oxygène de l'eau brûle une molécule de sucre, pendant que l'hydrogène libéré forme de la mannite aux dépens du lévulose conformément à l'équation :

$$13\ C^6H^{12}O^6 + 6H^2O = 12\ C^6H^{14}O^6 + 6\ CO^2 \quad (7).$$

L'équation (6) ne se prête pas à une comparaison immédiate avec cette formule; mais on peut la transformer en remontant de l'alcool au sucre et la mettre sur la forme :

$$5\ C^6H^{12}O^6 + 2\ H^2O = 2\ C^2H^4O^2 + 4\ C^6H^{14}O^6 + 2\ CO^2.$$

En multipliant les deux membres par 3 nous obtenons l'équation (8) plus facile à comparer à (7).

$$15\ C^6H^{12}O^6 + 6\ H^2O = 6\ C^2H^4O^2 + 12\ C^6H^{14}O^6 + 6\ CO^2 \quad (8).$$

1. Cité par M. Œchsner de Conink, *Chimie organique*.
2. *Ces Annales*, t. XV, p. 527.

En retranchant de (8) l'égalité suivante

$$2\,C^6H^{12}O^6 = 6\,C^2H^4O^2.$$

On retombe sur (7).

Une identification faite de cette manière entraîne comme conséquence une modification des propriétés physiologiques que le ferment manifeste en présence du glucose.

La décomposition de ce sucre fournit beaucoup d'alcool et peu d'acide acétique; avec le lévulose, c'est au contraire l'alcool qui est rare et l'acide acétique abondant; nous avons montré l'origine de cette contradiction apparente, et nous avons admis que le lévulose se disloque comme le glucose, en fournissant les mêmes produits et dans les mêmes proportions; ou, en d'autres termes, dans un même milieu, que ce soit en présence de glucose ou de lévulose, les quantités de diastases capables de s'attaquer directement aux sucres, mesurées par leur activités, sont les mêmes; si une nouvelle transformation se produit dans les milieux additionnés de lévulose, c'est parce que ce sucre se prête plus facilement à l'hydrogénation que le glucose.

L'acide acétique qui a sa place dans l'équation (8) a d'abord passé par le stade alcool; cette conclusion seule est justifiée par les faits, et l'identification de (7) et (8) n'est pas possible.

Considérée au point de vue thermochimique, c'est l'équation (8) qui dégage le plus de chaleur; elle est par conséquent plus facilement réalisable; elle est accompagnée d'une production de + $87^{cal},3$, tandis que (7) absorbe + $10^{cal},5$.

On ne peut relever entre elles d'autres différences, car l'une et l'autre donnent naissance, pour une même quantité de mannite formée, à un même volume d'anhydride carbonique.

Ce qui a conduit MM. Gayon et Dubourg à adopter la formule (7), c'est l'absence d'alcool dans leurs cultures à la fin de l'expérience.

L'anhydride carbonique ne pouvait donc pas être attribué à la fermentation alcoolique, et l'équation (7) en indiquait l'origine en même temps qu'elle permettait d'en prévoir le volume. Il y avait ainsi, comme le font remarquer MM. Gayon et Dubourg, substitution complète de la mannite à l'alcool, et partant, modification profonde dans les propriétés du ferment.

Une démarcation aussi nette entre deux ferments (celui de

M. Gayon et celui de la tourne), qui présentent dans les milieux glucosés un parallélisme remarquable, n'est peut-être qu'apparente. Puisque l'alcool, terme de transition, manque dans les cultures faites dans le bouillon Liebig ou l'eau de levure additionnés de lévulose, il suffit de le mettre en évidence dans un bouillon mieux approprié pour supprimer l'obstacle qui s'oppose à leur identification physiologique. On peut concevoir, en effet, que l'alcool produit se transforme intégralement en acide acétique, si les transformations exprimées dans l'équation (8) ne sont limitées que par la production d'alcool, sous l'influence de la zymase.

Nous avons donc été conduits à comparer entre eux le bouillon Liebig, l'eau de levure, et le bouillon de haricots, additionnés de la même quantité de sucre, au point de vue du développement de nos ferments; nous avons ainsi constaté que non seulement toute notre collection de microbes témoigne une préférence marquée pour le bouillon de haricots, mais que le ferment de M. Gayon lui-même suit la même règle [1].

Nous avons alors cultivé ce dernier dans les mêmes conditions que notre ferment des vins tournés; le milieu qui nous a servi est celui qui nous a fourni les résultats consignés au tableau I. Il provenait de la même préparation; il a été employé sous le même volume, stérilisé en même temps à l'autoclave ensemencé et placé en même temps à l'étuve à 30°.

Les résultats obtenus sont réunis dans le tableau (V).

TABLEAU V.

	Résultats enregistrés.		Résultats rapportés à 100 gr. de sucre disparu.	
	Glucose 3 0/0.	Lévulose 2,5 p. 0/0.	Glucose.	Lévulose
	gr.	gr.	gr.	gr.
Sucre disparu.........	13,110	24,379	100,	100,
CO^2 dégagé...........	3,463	2.837	26,4145	11,637
Alcool................	3,172	0,597	24,2967	2,448
Acide acétique........	0.331	2,909	2,5172	11,932
Acide lactique.........	3,839	2.964	44,2477	12.155
Mannite..............	0,000	14.880	»	61,147
Poids des microbes...	0,3675	0.405	2,8032	1,661
Durée de l'expérience.	6 jours.	5 jours.		
Totaux.....			100,1893	100,973

1. Le ferment mannitique faisait déjà partie de notre collection; il avait été isolé d'un vin blanc; mais il s'est montré moins vigoureux que celui de Gayon, que nous devons à l'obligeance de M. le Dr Binot, de l'Institut Pasteur; c'est avec ce dernier que nous avons réalisé les cultures dont nous donnons les résultats.

L'examen de ce tableau montre que le ferment mannitique, cultivé en présence de lévulose dans du bouillon de haricots, produit de l'alcool, comme le ferment de la tourne.

L'alcool obtenu provient du lévulose, car les 1200 c. c. de bouillon ne renfermaient que $0^{gr},178$ de sucre en dehors du lévulose introduit; $0^{gr},077$ provenaient de la semence et $0^{gr},101$ avaient été apportés directement par le milieu.

Dès lors, tous les produits du tableau V se prêtent aux mêmes interprétations que ceux du tableau I; nous ne les reproduirons pas ici ; nous nous contenterons de modifier les chiffres de la colonne 4, en recherchant par le calcul les quantités de produits formés, abstraction faite des transformations qui sont exprimées par l'équation (6).

Nous avons indiqué p. 591 le procédé qui permet de faire ces modifications; nous rapportons les résultats à 100 de sucre consommé, déduction faite de la mannite, et nous reproduisons, pour faciliter la comparaison, les chiffres fournis par la culture en milieu glucosé.

Voici ce que l'on obtient :

TABLEAU VI.

	Glucose.		Lévulose.	
Sucre consommé	100,	grammes.	100,	grammes.
CO^2 dégagé	26,4145	—	29,863	—
Alcool	24,2067	—	26,183	—
Acide acétique	2,5172	—	4,663	—
Acide lactique	44,2477	—	31,200	—
Poids des microbes	2,8032	—	4,263	—

Ces chiffres sont encore de même ordre de grandeur; de plus, ils reproduisent assez exactement, en valeur absolue, ceux du tableau III.

Nous retrouvons en outre une particularité que nous n'avions pas encore signalée; la proportion d'acide acétique croît en présence de lévulose; l'acide lactique décroît ; ce fait, sensible déjà dans le tableau III, s'accentue dans le tableau VI.

Ce résultat s'explique si l'on considère que c'est l'acidité du milieu qui arrête le développement de la culture et les actions diastasiques. En présence du lévulose, il y a deux sources d'acide acétique dont l'une, liée à la production de mannite, est relativement très active. Il en résulte que l'acidité totale qui doit s'élever au même taux, quel que soit le sucre offert, comprendra

d'autant plus d'acide acétique et, partant, d'autant moins d'acide lactique que la proportion de mannite par rapport au sucre disparu sera plus grande.

Ainsi, la parenté physiologique du ferment de M. Gayon et du ferment de la tourne s'affirme jusque dans les moindres détails. Elle se maintient naturellement dans les cultures faites en présence du sucre interverti.

Les résultats consignés au tableau VIII, comparés à ceux du tableau IV, ne laissent aucun doute à cet égard. Le milieu de culture renfermait 5 0/0 de sucre interverti.

TABLEAU VII.

	Culture nº 1.	Culture nº 2.
CO^2 dégagé	2.204 grammes.	3,579 grammes.
Alcool	1,096 —	2,109 —
Acide acétique	1,280 —	1.741 —
Acide lactique	4.046 —	5,250 —
Mannite	4.120 —	6.020 —
Poids des microbes	0,596 —	0,768 —
Durée des cultures	4 jours	5 jours.

On pourra peut-être distinguer ces deux microbes au point de vue physiologique, en les faisant agir sur des aliments variés; le seul caractère distinctif que nous ayons enregistré, c'est la rapidité plus ou moins grande avec laquelle il se multiplient; le ferment mannitique est très vigoureux; en quelques jours à 30° il a accompli un travail que le ferment de la tourne ne réalise qu'au bout d'un temps 2 ou 3 fois plus long.

A côté de cette différence, il y en a une autre non moins nette, qui relève de leur aspect et de leur forme. En culture jeune, le ferment de la tourne est un bâtonnet de longueur variable, absolument identique à celui qui a été dessiné par Pasteur; en vieillissant, les longs filaments sinueux augmentent beaucoup, surtout si la culture est anaérobie. Le ferment de M. Gayon est un gros bacille, court, disposé en chaîne plus ou moins longue; les éléments deviennent indépendants en vieillissant. Tous deux prennent le Gram.

RÉSUMÉ DES CONCLUSIONS

Le ferment des vins tournés étudié dans ce travail présente les mêmes propriétés physiologiques que le ferment mannitique de M. Gayon.

Il sécrète de la zymase, une diastase lactique, et probablement une troisième diastase capable de dédoubler le sucre en trois molécules d'acide acétique.

En présence de lévulose libre, il forme de la mannite; ce produit résulte d'une décomposition de l'eau dont les éléments se fixent d'une part sur l'alcool pour donner de l'acide acétique, et d'autre part sur le lévulose qui se transforme en mannite.

Voilà les différentes transformations que le ferment de la tourne fait subir au glucose et au lévulose ou à leurs dérivés immédiats; il y en a d'autres, mais elles sont beaucoup moins importantes que les précédentes en quantité, et elles n'influent pas d'une manière sensible sur la résultante des fermentations.

La décomposition de l'eau subordonnée à la présence du lévulose place ce ferment, avec celui de M. Gayon, dans un groupe à part qui ne tardera pas sans doute à compter d'autres représentants; nous pouvons même affirmer dès maintenant que les ferments de la « graisse » et de l'amer en feront partie.

Beaucoup de bactéries, en particulier les ferments butyriques, produisent de l'hydrogène; mais le gaz mis en liberté en présence de lévulose ne transforme pas celui-ci en mannite; il est vrai que ces mêmes ferments peuvent décomposer la mannite; l'excédent d'hydrogène libre devrait cependant hydrogéner le lévulose, si bien qu'à un moment donné on pourrait obtenir un mélange de mannite et de lévulose au cours de la fermentation.

Nous avons cultivé un amylobacter dans une solution de sucre interverti à 10 0/0 en présence de carbonate de chaux, dans le but de vérifier ce fait; nous n'avons jamais réussi à caractériser la présence de la mannite. Il y a donc chez les microbes une organisation qui permet la localisation des actions diastasiques; ils peuvent ainsi réaliser, parmi les réactions que la chimie prévoit, celles qui leur conviennent, et leur imprimer une direction déterminée. En un mot, la cellule vivante se présente comme un laboratoire organisé où les réactions chimiques, quoique se produisant simultanément, sont indépendantes les unes des autres.

Cette notion n'est pas neuve; mais il est bon de la rappeler en présence d'exemples aussi frappants que celui-ci.

Contribution clinique à la Sérothérapie
DE LA PESTE

Par A. DUPRAT,
Docteur en Médecine de l'Université de Paris.

Il est trop tôt pour présenter au public médical une description d'ensemble sur l'épidémie de peste qui règne ici, au Brésil, dans la ville de Rio Grande (do Sul) depuis le mois de décembre 1902.

La peste, à l'heure actuelle, faisant des apparitions un peu partout, il m'a semblé qu'il serait d'un certain intérêt pratique de faire connaître les résultats que nous tirons ici d'un nouveau traitement de la peste, le seul d'ailleurs véritablement efficace. Ils se sont d'autant plus imposés à notre conviction, qu'ils se rapportent tous à des cas dont la gravité ne laissait aucun doute sur le dénouement à attendre, avec toute autre médication.

Au début de l'épidémie qui nous occupe, les doses de sérum employées étaient de 60 c. c., 80 c. c., répétées ou non toutes les 12 ou 24 heures, suivant les circonstances. Chez les enfants, on employait le sérum à des doses moindres.

Soit dans les cas suivis de décès, soit dans les cas suivis de guérison, l'action du sérum ne me paraissait pas suffisante, c'est-à-dire que les modifications apportées à l'intensité de l'infection, ou encore, au cours de la maladie, n'étaient pas de nature à rassurer le praticien.

Comme il n'existe pas d'autre traitement pour le typhus levantin, je me suis proposé d'examiner si les faits que j'observais dépendaient, ou non, des doses employées.

Appelé en consultation auprès d'un jeune homme de 15 ans, atteint de peste depuis 5 jours, et dont l'état était des plus graves, j'ai conseillé les hautes doses de sérum, en injections sous-cutanées. Ce malade présentait plusieurs bubons; un à l'angle de la mâchoire, l'autre à l'aisselle gauche, et un troisième à la région inguinale droite : tous tuméfiés et douloureux. Le soir où nous vîmes le malade, nous lui avons fait la première injection : sa température était de 40° ; pouls 140, mou, dépressible; respiration 50 ; catarrhe bronchique, douleur intercostale

à la base du poumon gauche, du côté externe. Langue sèche, rétractée, diarrhée jaunâtre, selles fréquentes, soit le jour, soit la nuit. Subdélire, surtout nocturne.

Nous avons débuté par une injection de sérum Roux-Yersin de 180 c. c. ; 12 heures après, nouvelle injection de 120 c. c. et une troisième de 80 c. c. à la même distance. A partir de ce moment, l'infection étant dominée, nous espaçons les injections, qui ne sont plus que de 80 c. c. et 60 c. c. Le malade guérit, ayant reçu 520 c. c. en 5 injections, en 3 jours. Les bubons n'ont pas suppuré.

Encouragés par ce résultat, le Dr Euclides Miro Alves et moi, nous avons adopté comme règle de conduite l'emploi de très hautes doses de sérum.

Chez un enfant de dix ans, nous avons fait une première injection de 100 c. c, suivie d'une de 120 c. c. 12 jours après, et à la même distance, une autre de 80 c. c.; pour terminer, 24 heures après, une autre de 60 c. c. Soit, en tout, 360 c. c. en 48 heures.

A la première visite, le petit malade avait une température de 39° 8, pouls 130, dépressible, respiration fréquente, état d'abattement extrême. Il répondait difficilement aux questions que nous lui adressions. Quand il parlait, c'était pour prononcer des phrases incohérentes. De temps à autre, il était pris d'agitation, en proie à des hallucinations. Bubon inguinal gauche très douloureux. Ce malade guérit sans suppuration du bubon. A la convalescence il présenta un œdème des bourses.

Le sérum provoqua chez lui des douleurs articulaires généralisées, avec légère élévation de la température; le tout se dissipa en 4 jours.

Chez un jeune soldat dont la maladie remontait déjà à 24 heures, nous avons fait avec le Dr Miro Alves une première injection de 300 c. c. suivie 12 heures après, d'une seconde de 120 c. c., 24 heures après laquelle nous en fîmes une autre à la même dose, soit 540 c. c. en 3 injections et en 4 jours.

Ce malade guérit avec suppuration du bubon inguinal droit, apparue chez lui le deuxième jour de la maladie.

Quand nous entreprîmes le traitement de ce malade, son état était tel que le lendemain il n'avait pas conscience de l'injection que nous lui avions faite la veille.

Le Dr Ph. Caldas a soigné une enfant de neuf mois, avec des injections sous-cutanées, à la dose de 65 c. c. en 2 jours 1/2.

Chez une dame de 65 ans avec bubon axillaire gauche, ce praticien a débuté par une injection sous-cutanée de 180 c. c. suivie, 12 heures après, d'une autre de 200 c. c. La malade a guéri.

Chez une enfant de deux ans, présentant un bubon cervical droit, le Dr Marciano Espindola, débuta par une injection de 100 c.c. qui a suffi pour assurer la guérison du petit malade. Ce même médecin, assisté du Dr Ph. Caldas, a soigné un peintre, dont la maladie remontait déjà à trois jours, en débutant par une injection de 180 c. c. suivie, douze heures après, d'une autre de même dose ; douze heures après, le malade reçut une autre injection de 200 c. c. puis, douze heures après, une autre de 120 c. c. et enfin une dernière de 100 c. c. vingt-quatre heures après. Soit en tout 780 c. c. en 5 injections en 60 heures. L'état de ce malade était des plus graves. Qu'il me suffise de signaler, entre autres symptômes alarmants, celui de faire ses besoins dans son lit. Son bubon siégeait à la région inguinale gauche, et était en voie de suppuration quand nous vîmes le malade.

Appelé auprès d'un enfant de cinq ans, avec bubon cervical gauche, le Dr J. Damascena de Miranda, assisté du Dr Miro Alves, a commencé le traitement par une injection sous-cutanée de 100 c. c. suivie, douze heures après, d'une autre de 80 c. c., lesquelles ont suffi pour amener la guérison. Le bubon n'a pas suppuré.

Chez un de ses malades, plongé dans un profond abattement au point de ne pas répondre aux questions qu'on lui adressait, (température 39°,2, pouls 88) le Dr Lopes Rodrigues débuta par une injection sous-cutanée de 200 c. c., suivie le lendemain d'une autre de 120 c. c.

A la seconde visite, le malade s'est montré très étonné du traitement qu'on allait lui faire subir, et c'est seulement à ce moment qu'il apprit qu'il avait déjà été injecté la veille. Ce malade n'a pas présenté de bubon, à proprement parler. Vers le sixième jour de maladie il accusa de vives douleurs au siège d'élection des bubons, où on ne constatait qu'un léger infarctus ganglionnaire. L'observation de ce malade est intéressante au point de vue des accidents

sérothérapiques, qui ont consisté en une sorte de synovite généralisée, avec de vives douleurs et une immobilité absolue. La température est montée au-dessus de 39°. Pour terminer je citerai le cas d'une de mes malades âgée de 50 ans, chez laquelle j'ai fait pour débuter une injection de 200 c. c., renforcée douze heures après par une autre de 60 c. c. L'état de la malade m'inspirant encore quelques inquiétudes. je lui fis de nouveau douze heures après une autre injection de 120 c. c. Cette malade guérit, son bubon inguinal gauche n'a pas suppuré.

La plupart des malades ont présenté à peu près les mêmes symptômes. La maladie s'est déclarée le plus souvent la nuit, ou bien le matin, au lever. Frisson intense, céphalée violente, vomissement alimentaire bilieux, accompagné d'angoisse épigastrique; langue chargée, large, rouge sur les bords.

Chez quelques malades, on a noté, dès le début, de la diarrhée bilieuse, dans quelques cas, noirâtre, chez d'autres rachialgie intense, courbature généralisée. Yeux hagards, brillants, conjonctives injectées, température le plus souvent au-dessus de 40°. Pouls fréquent, plein et vibrant au début, mou, dépressible, filiforme par la suite; rarement irrégulier ou intermittent. Tonalité du choc cardiaque amoindrie. Urine le plus souvent abondante, dans quelques rares cas, franchement albumineuse. Foie et rate augmentés de volume, surtout cette dernière. Dans quelques cas, peu nombreux, légère teinte sub-ictérique de la conjonctive.

Chez le plus grand nombre des malades, à la période d'invasion, on remarquait une hyperesthésie marquée du revêtement cutané. Chez un petit nombre, par contre, l'insensibilité était telle que le malade se laissait piquer sans réagir.

Réflexes patellaires le plus souvent absents. délire loquace et actif, subdélire. Bubon précoce ou tardif, sans rapport avec la gravité de la maladie, ne fournissant par suite aucun élément de pronostic. Chez la plupart des malades, les bubons se sont résorbés.

La suppuration n'est survenue que dans un nombre restreint de cas. Le siège des bubons n'a présenté aucun rapport avec la gravité de l'infection. Par contre, leur multiplicité a été notée dans les cas les plus graves. La durée de la maladie a été, en moyenne, de sept jours. Quelques malades ne sont entrés en

convalescence qu'une vingtaine de jours après le début du mal. Chez la plupart, la convalescence a coïncidé avec une diminution de la fréquence du pouls, qui ne battait plus que 60 à 64 fois par minute. Nulle part il n'y a eu de charbons pesteux.

Les phlyctènes et les pétéchies ont été notées quelquefois ; dans un cas, on a vu un œdème aigu de la face, du cou et du bras du même côté. Tels sont les traits généraux cliniques de l'histoire de nos malades. C'est aujourd'hui un principe élémentaire que, dans le traitement de la peste, on doit avoir recours aux injections massives, de préférence aux petites injections souvent répétées.

Comme le font justement remarquer Agote et Medina, on n'est pas encore précisément fixé sur ce que l'on doit entendre par injections massives ; car le *quantum* conseillé par les différents auteurs qui se sont occupés de la peste, varie de 40 c. c. (Calmette et Salimbeni) à 100 c. c. (Zabolotny) par injection.

C'est à propos de l'épidémie de la ville de Porto, que Calmette et Salimbeni ont introduit dans le traitement de la peste la méthode des injections intra-veineuses de sérum. En employant cette méthode, soit seule, soit combinée avec les injections sous-cutanées, ils sont arrivés à n'avoir qu'une mortalité de 14,7 0/0.

Le docteur Pena (de Buenos-Ayres), en employant exclusivement la méthode des injections intra-veineuses, aux doses de 60 c. c. et 40 c. c., espacées de 12 ou de 24 heures, a obtenu le taux de 19, 9 0/0 de mortalité.

Nous n'avons pas eu l'occasion d'appliquer cette méthode. Elle nécessite une technique et des précautions spéciales qui ne sont pas compatibles avec toutes les circonstances avec lesquelles le praticien peut se rencontrer.

Dans son rapport à l'Académie de médecine de Paris sur l'épidémie de peste de la Réunion en 1901, le docteur Vassal fait mention de l'emploi de 440 c. c. de sérum chez une enfant de dix ans. Malgré ces faits, nous ne sachons pas que l'on ait encore érigé en méthode, le traitement de la peste par les hautes doses de sérum Roux-Yersin employées systématiquement.

La statistique que voici comprend 45 cas. La mortalité générale a été de 20 0/0.

Malades traités....................................	45
Nombre de décès....................................	9

Mortalité	20 0/0
INJECTIONS INITIALES INFÉRIEURES A 100 C. C.	
Malades traités	16
Nombre de décès	5
Mortalité	31.25 0/0
INJECTIONS INITIALES SUPÉRIEURES A 100 C. C.	
Malades traités	29
Nombre de décès	4
Mortalité	13.78 0/0

En la décomposant en deux séries, nous avons une mortalité de 31, 25 0/0 pour les cas traités par des injections inférieures à 100 c. c. et une mortalité de 13, 78 0/0 pour les cas traités par les hautes doses de sérum d'emblée. Ce chiffre est à notre connaissance le plus favorable que l'on ait atteint, dans les différentes épidémies de peste de ces derniers temps. Il est vrai que la première fois que le sérum Roux-Yersin a été appliqué, Yersin a eu une mortalité de 2 cas sur 26 malades traités, mais il n'a plus retrouvé un semblable résultat. Nous sommes convaincus que des injections sous-cutanées initiales à des doses supérieures à 300 c. c. rendront de précieux services, dans plus d'un cas; nous nous proposons d'en observer les résultats aussitôt que l'occasion se présentera. Ce qui est acquis, c'est que ces grandes injections rendent réellement de signalés services, et ne sont suivies d'aucun inconvénient, général ou local, pour les malades, soit actuels, soit éloignés.

Il est même vrai de dire que les quelques accidents, imputables à la sérothérapie, qu'il nous a été donné d'observer, ont plutôt coïncidé avec les petites injections. A l'exemple de Denis et Tartakowky, nous avons fait les grandes injections dans le triangle de Scarpa, chez des malades présentant déjà des bubons dans cette région. Nous avons observé à notre tour que, dans ces conditions, l'action du sérum était plus marquée. Nous ne pouvons cependant présenter aucune conclusion définitive, étant donné le nombre restreint des cas de ce genre que nous avons vus.

Au moyen des grandes injections sous-cutanées de sérum Roux-Yersin, employées dès la période d'invasion, on devient tout de suite maître de la situation, et le malade guérit rapidement; ou bien la maladie prend des allures d'une infection bénigne, facile à combattre par les moyens ordinaires.

Les petites injections n'exercent pas d'action décisive sur les

accidents primitifs. Comme on l'a fait, je crois, déjà remarquer, elles prolongent la durée de la maladie.

Le groupe de malades soignés par les grandes injections sous-cutanées initiales, comprend un ensemble de 29 cas avec 4 décès (13,78 0/0).

Parmi les décès, trois se rapportent à des individus recueillis au Lazaret, à une période avancée de la maladie, qui remontait déjà de 5 à 7 jours. Le quatrième décès est celui d'un soldat qui mourut environ 8 heures après la première injection.

Le fait suivant est encore à enregistrer à l'actif des avantages de la sérothérapie.

Tandis que, dans l'entourage des malades atteints de peste, non traités par la sérothérapie, les cas de contagion sont fréquents, nous n'en avons pas observé parmi ceux qui accompagnaient les malades traités par le sérum.

Au Lazaret, où tous les malades sont soignés par la sérothérapie, quoique le personnel n'ait pas été immunisé, soit par la vaccine, soit par le sérum, on n'a eu à déplorer chez lui aucun cas de peste, tandis que le soldat qui était chargé de conduire ses camarades a fini par tomber malade.

De l'ensemble des faits que nous avons observés, nous croyons pouvoir déjà tirer les conclusions suivantes :

1° Le sérum Roux-Yersin est réellement efficace contre la peste, et constitue le traitement de choix;

2° Les doses à employer dépendent, non pas de l'âge du sujet, mais de son degré d'infection ;

3° Pour arriver à des résultats réellement utiles, il faut débuter par de très hautes doses, et ne pas hésiter à les répéter toutes les 12 heures, tant qu'un changement notable dans l'état général du malade n'est pas venu indiquer que l'on est maître de l'infection primitive;

4° La voie sous-cutanée est suffisante par elle-même, à condition que l'on débute par une injection de 200 ou 300 c. c. et même plus.

Le sérum que nous employons est préparé à l'Institut sérothérapique de Rio de Janeiro.

Rio Grande (do Sul), 18 mai 1903.

Les Vaccinations antirabiques à l'Institut Pasteur de Lille.

PAR LE Dr VANSTEENBERGHE, CHEF DE LABORATOIRE

Depuis la fondation de l'Institut Pasteur de Lille, en février 1895, jusqu'au 31 décembre 1902, 1,807 personnes ont subi le traitement préventif de la rage.

De ces 1,807 personnes, 457 avaient été mordues par des animaux dont la rage a été expérimentalement constatée à l'Institut (catégorie A).

784 nous apportaient des certificats de vétérinaires ayant constaté la rage chez l'animal vivant ou après autopsie (catégorie B).

566 enfin avaient été mordues par des chiens fortement suspects de rage, ou qui n'ont pas été retrouvés.

La mortalité totale a été pendant cette période de 7 années, de 4 personnes, soit 0,22 0/0.

La méthode de traitement a toujours été la même depuis le début.

Nous employons le procédé de conservation des moelles rabiques dans la glycérine, procédé indiqué depuis longtemps déjà par M. le professeur Calmette et expérimenté par lui à Saïgon.

Cette méthode, qui nous a donné, comme on l'a vu plus haut, les meilleurs résultats, est extrêmement commode dans la pratique, très économique, et répond par suite à toutes les exigences d'Instituts ayant à traiter un petit nombre de personne mordues.

Il suffit en effet, pour se procurer toute la série des moelles atténuées, de faire des passages de virus fixe tous les 10 jours.

Les moelles desséchées dans les flacons à potasse sont conservées à l'étuve à température constante, comme d'habitude.

A partir de la 48e heure d'étuve, on coupe des fragments de moelle sèche (2 ou 3 morceaux de 5 centimètres de long environ) que l'on immerge aussitôt dans de petits flacons bouchés à l'émeri et renfermant de la glycérine stérilisée.

La virulence de ces fragments se conserve pendant un mois à peu près.

On fait tous les jours une opération identique jusqu'au 14e jour de dessiccation, et la série des moelles atténuées ainsi conservées en glycérine peut être utilisée pendant 25 à 30 jours.

Au début du traitement, on utilise les moelles de 14 à 3 jours de dessiccation, ayant séjourné de 20 à 25 jours en glycérine.

Enfin, les 4 derniers jours, on inocule des moelles n'ayant été immergées dans la glycérine que 5 à 10 jours.

Pour l'inoculation, on prend un petit tronçon de moelle de 3 à 5 millimètres de long; on essuie soigneusement l'excès de glycérine avec un papier à filtre stérilisé.

Le morceau ainsi débarrassé de glycérine se triture facilement et s'émulsionne très bien dans 5 c. d'eau salée physiologique.

Ces injections sont parfaitement supportées par les malades. On a vu au début les résultats généraux. Les tableaux suivants donnent tous les renseignements statistiques détaillés.

Le nombre des personnes traitées varie considérablement d'une année à l'autre.

En 1895 nous	avons traité	109	personnes.
1896	—	207	—
1897	—	254	—
1898	—	238	—
1899	—	438	—
1900	—	252	—
1901	—	191	—
1902	—	118	—

De ces 1807 personnes, 1008 étaient originaires du département du Nord.

363	—	—	du Pas-de-Calais.
419	—		de la Belgique.
7	—	—	de l'Aisne.
5	—	—	de la Somme.
2	—	—	de l'Oise.
1	—	—	de la Seine-Inférieure.
1	—	—	de la Seine-et-Marne.
1	—	—	de la Dordogne.

La gravité des morsures est établie pour les 3 catégories A, B et C, dans le tableau suivant :

	A	B	C	Total.
Morsures à la tête.	58	71	46	175
— aux mains.	263	422	276	961
— aux membres.	136	291	244	671
Total.	457	784	566	1807

Les animaux mordeurs ont été :

Chiens.. 1688

Chats	111
Chevaux	2
Anes	2
Chèvre	1
Renne	1

Enfin, 2 personnes ont été traitées après avoir eu des écorchures aux mains en contact avec la salive d'un homme mort de rage aiguë.

Nous n'avions pas observé de relation entre les saisons et le nombre des individus mordus. En faisant le total par mois des personnes traitées pendant ces 7 dernières années, nous trouvons :

Janvier	141
Février	111
Mars	144
Avril	149
Mai	133
Juin	173
Juillet	169
Août	159
Septembre	111
Octobre	196
Novembre	148
Décembre	173

L'INSTITUT PASTEUR DE PERNAMBUCO

PAR M. LE Dr OCTAVIO DE FREITAS

L'Institut Pasteur de Pernambuco a été solennellement inauguré le 31 janvier 1899 par la *Junta da S. Casa de Misericordia du Recipe*, pieuse institution qui a dans cette grande ville accaparé presque tout le service de l'Assistance publique.

L'Institut a été organisé et dirigé jusqu'au mois de mars 1901 par mon dévoué prédécesseur, le docteur Rodolpho Galvâo. Il est situé dans un quartier central, rue Hospicio, no 3.

Le traitement habituel se fait pendant 16 jours et suivant cette formule, qui est une petite variante de celle adoptée à Paris :

Jour du traitement.	Age de la moelle. desséchée.	Quantité de l'émulsion.
1	14 jours. 13 »	5 c. c.
2	12 » 11 »	» 5
3	10 » 9 »	5 »
4	8 » 7 »	5 »
5	6 »	3 »
6	6 » 5 »	5 »
7	5 »	3 »
8	5 »	3 »
9	5 » 4 »	3 »
10	4 »	3 »
11	4 »	3 »
12	4 » 3 »	5 »
13	3 »	3 »
14	3 »	3 »
15	3 » 2 »	5 »
16	2 »	3 »

Le service médical est fait par un médecin directeur et deux autres auxiliaires.

Les premières personnes mordues par des animaux enragés

ou suspects, traitées en notre Institut, y ont été admises deux semaines après son installation, le 16 février 1899.

Depuis ce jour jusqu'au 30 juin 1903, pendant quatre années et demie, cet établissement a été fréquenté par 589 personnes groupées d'après les années, les mois et les sexes, de la façon suivante :

	1899		1900		1901		1902		1903		Somme		
	h.	f.	h.	f.	h.	f.	h	f.	h.	f.	h.	f.	T.
Janvier.	»	»	»	»	4	4	19	12	4	2	27	18	45
Février.	4	1	2	3	5	1	15	8	5	1	31	14	45
Mars.	16	1	1	»	10	3	16	5	16	1	59	10	69
Avril.	5	»	4	2	3	3	12	6	6	2	30	21	51
Mai.	3	1	2	1	4	4	16	6	14	4	39	16	55
Juin.	2	2	6	»	1	»	14	1	14	6	37	9	46
Juillet.	3	2	4	1	16	6	7	4	—	—	30	13	43
Août.	6	2	5	4	10	3	13	3	—	—	34	12	46
Septembre.	8	6	1	1	16	4	5	3	—	—	30	14	44
Octobre.	5	4	»	»	21	2	4	1	—	—	39	7	37
Novembre.	8	4	2	»	19	8	4	»	—	—	33	12	45
Décembre.	»	»	3	»	31	23	5	1	—	—	39	24	63
Total...	60	31	30	12	140	61	130	50	59	16	419	170	589

Toutes ces personnes cependant ne furent pas soumises au traitement antirabique.

53 d'entre elles furent renvoyées sans traitement, soit parce que la dent de l'animal mordeur n'avait pas entamé les tissus, soit parce que l'animal qui avait mordu ne présentait aucun symptôme de la maladie.

Parmi ceux qui suivirent le traitement, 10 le suspendirent après avoir vérifié que l'animal mis en observation n'était pas malade, 40 quittèrent l'Institut sans aucun motif au bout de 3-4 jours.

Déduisant ceux-là, il reste 486 personnes qui suivirent le traitement complet.

On voit par le tableau ci-dessus que la fréquentation de notre Institut augmente d'année en année.

Une telle augmentation s'explique parce que avec le temps, l'établissement est plus connu, et il y vient des patients non seulement de Pernambuco et des municipes de l'intérieur, mais aussi des autres États.

Notre Institut est forcément appelé à rendre de grands services aux États du Nord, vu que dans tout le Brésil il n'existe que lui et celui de Rio-de-Janeiro.

Voici la statistique des mordus d'après le lieu où ils furent blessés.

	1899	1900	1901	1902	1903	TOTAL
Pará.	»	»	1	»	»	1
Maranhão.	»	»	»	1	»	1
Ceará.	1	»	1	1	»	3
Parahyba.	1	7	1	4	»	13
PERNAMBUCO.	78	31	177	157	67	511
Alagoas.	»	1	1	»	3	5
Bahia,	1	1	»	»	»	2

Je dois faire remarquer qu'une grande quantité de chiens vagabonds infestent notre capitale et disséminent partout la rage.

En effet, parmi les 536 personnes qui suivirent le traitement préventif dans l'Institut, 241 furent contaminées dans la ville du Recipe (capitale), ou soit 46,8 0/0.

Le plus grand nombres des morsures ont été faites par des chiens (86, 1 0/0 des cas), comme on pourra le voir par le tableau comparatif :

	1899	1900	1901	1902	1903	Somme.
Chien.	63	38	165	143	53	461
Chat.	17	3	14	21	16	71
Singe.	»	»	1	»	»	1
Homme.	1	»	1		1	3

Il est donc urgent de prendre des mesures de police sanitaire tendant à restreindre ce nombre considérable de chiens vaga-

bonds, telles que l'inscription sur un registre, la mise à mort des chiens errants conduits en la fourrière et non réclamés après un certain temps de la réclamation d'une réparation pécuniaire aux propriétaires dont les chiens ont causé quelque dommage.

Nous avons classé les personnes traitées en trois catégories, comme cela se fait à Paris :

Série A. La rage de l'animal a été vérifiée expérimentalement par le développement de la maladie chez les animaux mordus par lui ou inoculés avec son bulbe ;

Série B. La rage a été vérifiée par l'examen vétérinaire.

Série C. L'animal est suspect de rage.

Dans des autres centres, où les moyens d'investigation sont plus faciles et la culture scientifique plus perfectionnée, les deux premières séries comprennent un plus grand nombre d'individus, vu que l'animal qui a mordu est mis en observation, examiné par des vétérinaires, et que son bulbe est inoculé pour démontrer le diagnostic de rage.

Une croyance populaire très répandue chez nous admet que l'individu mordu par un chien ou un autre animal peut être contaminé dès que la rage éclate chez l'animal mordeur, alors même que celui-ci aurait été bien portant au moment de la morsure. Cette croyance erronée fait que souvent la personne qui est mordue sacrifie immédiatement l'animal ; elle est ainsi persuadée qu'elle ne court plus aucun danger si l'animal mordeur devient enragé dans la suite.

Il en résulte que la série des individus mordus par des animaux suspects est très nombreuse. Ainsi, sur 486 personnes qui ont suivi jusqu'à la fin le traitement préventif de la rage :

118	appartenaient	à la série	A.
172	—	—	B.
196	—	—	C.

Une des personnes de la série A avait été mordue dans la capitale de l'État du Para par un chien, en même temps que deux autres qui ne voulurent pas suivre le traitement anti-rabique. Celles-ci moururent de la rage, tandis que la personne traitée est bien portante encore aujourd'hui, plus de deux ans après la morsure.

Sur 486 personnes soignées jusqu'aujourd'hui, il y a eu 1 décès, celui d'un enfant de 9 ans, habitant rue Direita n° 73,

paroisse Saint-Antoine. Cet enfant fut mordu le 2 mars de cette année, par un chien suspect appartenant à la tante de la victime, et qui, tout de suite après la morsure, fut sacrifié sans que la maladie de l'animal fût vérifiée.

Trois jours après il fut soumis au traitement antirabique. La blessure avait été faite sur partie découverte, elle avait saigné et n'avait pas été cautérisée.

Deux mois après le 27 mai, je fus appelé pour examiner l'enfant, qui présentait des symptômes évidents de la rage. Deux jours après, ce malheureux enfant mourait.

On voit donc que le pourcentage de la mortalité observé dans notre Institut est de 0,2 0/0.

Des 486 personnes qui suivirent le traitement complet, 263 présentaient des blessures sur des parties découvertes (16 à la tête, joues, lèvres et nez; 171 aux mains, 24 aux pieds déchaussés et 52 aux jambes nues), 223 autres avaient été mordues à travers les chaussures ou les vêtements (pieds, 43; jambes, 76; cuisses, 28; tronc, 20; bras, 36; et avant-bras, 40).

La croyance populaire a vulgarisé l'usage de l'ail pilé, pour les morsures de chiens hydrophobes ou suspects. C'est à ce remède que recoururent la plus grande partie des individus mordus. Le résultat le plus évident de cette pratique fut une inflammation intense des blessures.

Dans 62 cas, la cautérisation fut faite avec :

Citron	21
Sulfate de cuivre	2
Acide phénique	13
» azotique	3
Nitrate d'argent	8
Ammoniaque	9
Feu	6

Le bon résultat obtenu par notre Institut est dû en grande partie à ce que les personnes mordues se présentent aussitôt après avoir été mordues, pour être soignées.

Ainsi commencèrent le traitement dans la

1re semaine	394
2e —	68
3e —	25
4e —	19

Juillet 1903.

Compte rendu statistique de l'Institut Pasteur de Kharkoff
Pour une période de 10 ans (1892-1901).

Par S. KOTZEVALOFF
Sous-directeur de la station bactériologique de la Société médicale de Kharkoff.

L'Institut Pasteur de Kharkoff, fondé en 1887 par la Société médicale de cette ville, dessert actuellement les gouvernements de Kharkoff, de Koursk, de Ekaterinoslav, de Stavropol, le territoire des Cosaques du Don, les territoires de Terek et de Kouban et une partie des gouvernements de Poltava, de la Tauride, d'Orel et de Voronège.

Les vaccinations se font, dans cet Institut, deux fois par jour et durent de 7 à 14 jours, suivant la gravité des blessures. Dans les cas les plus graves, on prescrit un second traitement qui commence un mois après la fin du premier et dure 5 jours.

Pendant la période considérée (1892-1901), le nombre de personnes, mordues par différents animaux supposés enragés, qui ont suivi un traitement à l'Institut a été de 9,390. De ce nombre, 1,202 ont été mordues par des animaux dont la rage a été prouvée par l'inoculation de leurs cerveaux à des lapins; 1,221, par des animaux reconnus enragés par des vétérinaires; 6,146, par des animaux qui, d'après les descriptions données des symptômes qu'ils présentaient de leur vivant, pouvaient être considérées, avec toute probabilité. comme atteintes de rage; enfin 321, par des animaux sur la maladie desquels on n'a pu avoir aucuns renseignements. De plus, ont suivi un traitement à l'Institut 350 personnes qui, sans avoir été mordues, s'étaient trouvées, d'une façon quelconque, en contact avec des animaux suspects. Le chiffre total des personues vaccinées s'élève donc à 9,740. Dans ce nombre, nous trouvons 6,039 hommes et 3,701 femmes. Les personnes ayant suivi un second traitement sont au nombre de 436.

La maladie a eu une issue mortelle dans 109 cas seulement, c'est-à-dire dans 1,16 0/0 de cas. Si nous en déduisons les personnes mortes pendant le traitement ou dans les 15 jours qui l'ont suivi, nous obtenons le chiffre de 56 personnes, c'est-à-dire 0,59 0/0 de cas. En considérant le chiffre des malades et des morts, d'abord dans la première, ensuite dans la seconde période de 5 ans, nous trouvons que, pendant la première (1892-1896), le nombre des malades a été de 2,805, dont 40 seulement, c'est-à-dire de 1,43 0/0 sont morts; le chiffre des morts dans la

première quinzaine qui a suivi le traitement a été de 21, c'est-à-dire 0,75 0/0. Dans la seconde période (1897-1901), le nombre des personnes traitées à l'Institut a été de 6,585; parmi elles, 59, c'est-à-dire 0,89 0/0 seulement, sont mortes; le chiffre des malades morts dans la première quinzaine après la fin du traitement a été de 25, c'est-à-dire des 0,38 0/0.

Les tables suivantes indiquent l'espèce animale par laquelle ils ont été mordus et la place de la blessure; elles montrent en même temps le 0/0 de la mortalité pour chaque catégorie. Cette mortalité a été calculée de deux façons : d'abord en considérant le chiffre total des cas mortels dans une des catégories indiquées, ensuite en ne considérant que les cas qui se sont produits dans la première quinzaine après la fin du traitement.

TABLE I. — L'ESPÈCE ANIMALE.

L'ESPÈCE animale.	NOMBRE des personnes soignées	CHIFFRE total des morts.		MORTS PENDANT la 1re quinzaine après le traitement.	
		Nombre	0/0	Nombre.	0/0
Chien	8430	77	0,91	42	0,49
Chat	556	0	0	0	0
Loup	193	32	16,58	14	7,25
Bœuf et vache	90	0	0	0	0
Cheval	53	0	0	0	0
Porc	26	0	0	0	0
Hommes	24	0	0	0	0
Brebis	9	0	0	0	0
Ane	4	0	0	0	0
Chacal, singe, rat,	chacun une fois.				
Total	9390	109	1,16	56	0,59

TABLE II. — L'ENDROIT DE LA BLESSURE.

ENDROIT de la blessure.	NOMBRE des personnes soignées.	CHIFFRE total des morts.		MORTS PENDANT la 1re quinzaine après le traitement.	
		Nombre.	0/0	Nombre.	0/0
Membres supér.	5301	34	0,64	25	0.47
Membres infér.	2601	2	0,08	1	0,04
Tête et visage ...	946	73	7,72	30	3,17
Corps............	542	0	0	0	0
Total............	9390	109	1,16	56	0,59

Les tables ci-dessus montrent que les morsures faites par le loup fournissent un 0/0 de mortalité très considérable. A l'exception du loup et du chien, aucun autre animal n'a fait de morsures ayant occasionné la mort. Nous voyons ensuite que les morsures faites à la tête et au visage donne un 0/0 considérable de mortalité; celles faites aux membres supérieurs viennent ensuite, tandis que celles des membres inférieurs donnent un 0/0 insignifiant. Enfin, parmi les personnes mordues sur les autres parties du corps, aucune n'a succombé.

Dans les 98 cas mortels dans lesquels on a pu connaître le jour de l'accident, la période d'incubation a duré de 13 à 341 jours (dans un cas).

La table suivante donne une idée du rapport qui existe entre la durée de la période d'incubation et l'endroit de la blessure :

ENDROIT de la blessure.	CHIFFRE total des morts.	MORTS dans la 1re quinzaine du 1er mois.		MORTS dans la 2e quinzaine du 1er mois.		MORTS durant le 2e mois.		MORTS durant le 3e mois.		MORTS après 3 mois.	
		Nombre	0/0	Nombre.	0/0	Nombre.	0/0	Nombre.	0/0	Nombre.	0/0
Tête et visage.	67	6	8,95	30	43,77	23	35,82	1	1,49	7	10.44
Membres.....	31	0	0	8	25,8	13	41,61	5	16,13	5	16,13

Le Gérant : G. MASSON.

Sceaux. — Imprimerie Charaire.

17me ANNÉE OCTOBRE 1903 N° 10

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

Sur la résorption phagocytaire des ovules chez les Tritons

Par CH. PÉREZ

La prépondérance de l'englobement phagocytaire sur la dissolution humorale est un fait aujourd'hui établi, en ce qui concerne la résorption des microbes par les organismes réfractaires ou immunisés. Il en est de même pour la résorption des cellules d'organismes supérieurs introduites par injection expérimentale dans le milieu intérieur d'un animal. Mais en ce qui concerne, au contraire, le processus par lequel un organisme résorbe *in situ* ses propres cellules, la question est encore vivement discutée. Pour n'en citer qu'un exemple, des travaux récents relatifs à la métamorphose des Insectes n'ont pas été sans jeter, aux yeux de beaucoup de naturalistes, quelque discrédit sur les interprétations phagocytaires données par les travaux de Kowalevsky et de Van Rees. On ne peut guère se proposer d'étudier d'une manière systématique les résorptions sporadiques d'individus cellulaires qui, çà et là, à un moment ou à l'autre, peuvent se produire dans les tissus d'un organisme au cours de sa vie. On est forcé de se restreindre aux cas où, dans un temps relativement court et dans une même région localisée de l'organisme, un grand nombre de cellules analogues subissent une atrophie simultanée. Du moins ne me paraît-il pas hors de propos de revenir sur des faits de cet ordre, même déjà connus, ne fût-ce que pour préciser d'avantage les détails du processus atrophique.

Dans une revue critique très suggestive (*Année Biologique* pour 1897), Metchnikoff a montré la large extension que paraissait

avoir dans ces atrophies un processus de digestion intracellulaire, les macrophages se substituant peu à peu, sous forme de tissu conjonctif, aux cellules différenciées des organes qu'ils ont phagocytés. L'illustration la plus typique de cette thèse paraît être fournie par la résorption des ovules chez les Vertébrés. De nombreux mémoires ont paru sur ce sujet ; mais si la question est tranchée en gros, il n'est peut être pas inutile d'en examiner à nouveau quelques détails.

Mes recherches ont porté sur les Amphibiens urodèles, auxquels RUGE (1889) a déjà consacré un mémoire assez étendu. Plusieurs observateurs, tout dernièrement encore DUBUISSON (1903), ont signalé, chez ces animaux et chez d'autres Vertébrés, une dégénérescence « normale », c'est-à-dire une résorption sporadique, plus ou moins accusée, des ovules, chez des individus sacrifiés peu après la capture, et supposés par conséquent avoir été saisis dans leurs conditions normales. On doit penser toutefois que cette atrophie des ovules est souvent sous la dépendance immédiate de conditions de nutrition générale ; les observations ont plus d'une fois porté sur des animaux élevés au laboratoire, dans des conditions peut-être défavorables et assurément peu naturelles ; tel était sans doute le cas du *Lepidosiren* examiné par BEDDARD (1886)[1]. Chez le moineau, VON BRUNN (1882) a signalé un retour périodique annuel des phénomènes atrophiques des ovules, coïncidant avec les semaines d'incubation et de nourrissage des jeunes. MINGAZZINI (1893) a constaté des atrophies particulièrement nombreuses chez des Amphibiens et des Reptiles longtemps conservés en captivité. Enfin M. DUBUISSON a bien voulu me communiquer que la dégénérescence « normale » s'observe surtout chez les Urodèles au moment où ces animaux quittent les mares, après la ponte ; or la période de vie aquatique est à la fois la période d'activité génitale et la période d'abondante alimentation ; le retour à terre marque le début du jeûne pendant l'estivation, puis l'hivernage. C'est précisément par l'influence du jeûne expérimental que j'ai obtenu chez les tritons la résorption des ovules, avec une inten-

1. La véritable signification du processus atrophique a d'ailleurs échappé à BEDDARD, qui a cru à une naissance des ovules par fusion de plusieurs cellules. Beaucoup d'auteurs ont d'ailleurs méconnu le rôle des phagocytes dont ils observaient l'immigration dans les ovules, et les ont interprétés comme des cellules élaborant les réserves vitellines.

sité et une extension tout à fait remarquables du processus atrophique.

A la fin du mois de décembre dernier et dans les premiers jours de janvier, des tritons marbrés *Molge marmorata* [Duméril et Bibron], furent recueillis dans une mare des environs de Bordeaux, en pleine période génitale : les mâles avec leur crête dorsale bien accusée, les femelles avec un abdomen dont la distension annonçait une ponte prochaine. Ces femelles furent soumises en aquarium à un jeûne complet, et sacrifiées successivement après 4 à 7 mois de ce traitement. Des observations analogues ont été faites sur des tritons palmés, *Molge palmata* [Dug].

A la simple dissection, les ovaires des femelles soumises au jeûne présentent au premier abord un aspect caractéristique. Chez les tritons marbrés, à côté de petits ovules d'un blanc hyalin, qui ont l'apparence et, comme on le verra plus loin, la structure des jeunes ovules normaux, on voit en abondance des ovules, ayant à peu près la taille d'ovules mûrs, mais reconnaissables à une vive teinte jaune orangé, rappelant tout à fait celle des corps jaunes adipeux de la même espèce.

Chez une femelle témoin, alimentée, les ovules sur le point d'être pondus sont d'un blanc verdâtre très pâle. L'irrigation capillaire de l'ovaire normal est peu perceptible à l'œil nu, à cause de la ténuité et de l'espacement des dernières ramifications vasculaires. Au contraire, dans les ovaires atrophiés, les ovules orangés sont enveloppés dans les mailles serrées d'un réseau capillaire hyperhémié tout à fait apparent. Chez les tritons palmés, on constate une pareille congestion des capillaires; mais les ovules atrophiés, au lieu d'une teinte orangée, présentent un obscurcissement progressif par l'accumulation d'un pigment brun très foncé. L'étude microscopique donnera l'explication de ces particularités.

La structure des ovules en voie de croissance normale est classique, et je ne crois pas utile d'y insister ici. La figure intercalée dans le texte (fig. A) suffit à rappeler l'aspect de la périphérie d'un ovule mûr, prêt à être pondu : en dehors de la *zona radiata* superficielle et de la membrane vitelline, on voit le follicule mince tendu sur l'ovule turgide, avec ses noyaux aplatis

tangentiellement par l'effet de cette tension. De rares capillaires superficiels sont eux-mêmes fort déprimés, et leur lumière se présente comme une fente étroite tangentielle.

Dans les ovules en résorption, le noyau ne tarde pas à disparaître par karyolyse. Je laisserai de côté ce processus, que je n'ai pas étudié, me bornant à constater avec Ruge que, si la disparition du noyau est précoce, elle est cependant postérieure au début des phénomènes dont la périphérie de l'ovule est le siège, et qui amènent la résorption du vitellus. Je n'ai rien observé

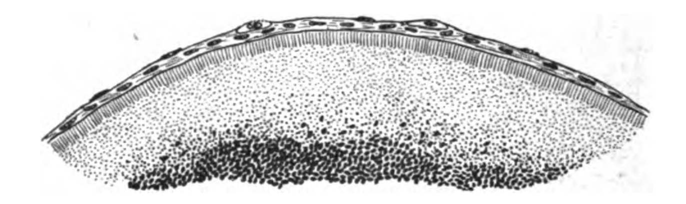


Fig. A.

dans les phénomènes nucléaires qui rappelât la « dégénérescence par fragmentation », analogue à la segmentation, que Henneguy (1894) a décrite dans l'atrésie des follicules de Graaf chez les Mammifères.

La résorption des ovules débute par l'hypertrophie des cellules folliculaires. Au lieu de rester aplaties à la surface de l'ovule, elles acquièrent dans le sens radial une épaisseur notable, leurs noyaux prennent une forme ovoïde, et on peut en trouver un certain nombre en voie de division indirecte. La membrane vitelline disparaît ainsi que la *zona radiata;* chacune des cellules folliculaires fait saillie comme une papille vers l'intérieur de l'ovule et leur ensemble forme une assise épithéliale d'allure glandulaire. Je n'ai pas à insister sur le détail de ce processus, qui a déjà été décrit par Ruge; la fig. 1., pl. XIV, est suffisamment explicite à cet égard. Je me borne à préciser le rôle phagocytaire des cellules du follicule : il est rendu tout à fait manifeste grâce à cette particularité que l'ovule, au voisinage de sa maturité, a son protoplasme bourré, avec une densité extrême, de corps figurés, à forme et à réactions colorantes bien caractéristiques : ce sont les tablettes vitellines. Or, on voit ces dernières englobées à dose massive par les cellules folliculaires, dont elles rem-

plissent au moins toute la partie profonde, accumulées d'une manière tout aussi dense que dans le cytoplasme ovulaire lui-même. Lorsque l'inclusion et les coupes sont tout particulièrement réussies, il est presque impossible de discerner la limite profonde des phagocytes folliculaires au milieu du semis compact des granules vitellins, qui s'étend depuis les régions profondes de l'ovule jusqu'au niveau des noyaux du follicule. Mais en général une plasmolyse irrégulière fait apparaître un petit méat de décollement entre l'assise des phagocytes et la périphérie même de l'ovule. (Pl. XIV, fig. 1.)

Les granules vitellins englobés sont digérés à l'intérieur des phagocytes folliculaires, et la graisse est le plus manifeste des produits transitoires de leur transformation. Cette graisse, en gouttes réfringentes, occupe surtout la partie périphérique des phagocytes, celle qui touche au revêtement péritonéal. Si quelques-unes de ces gouttes sont à peu près incolores, la plupart sont, au contraire, chez le triton marbré, teintées de jaunes variés; et le plus souvent, ce sont les plus petites qui sont du jaune orangé le plus vif, comme si un lipochrome dissous se concentrait dans la goutte, au fur et à mesure que le dissolvant gras est lui-même peu à peu résorbé. Ce sont ces gouttelettes qui donnent aux ovules en résorption leur teinte caractéristique. Entre les gouttelettes grasses, les trabécules protoplasmiques sont incolores. Chez le triton palmé, il y a formation beaucoup plus accusée d'un pigment brun plus foncé, et qui, au lieu de se dissoudre dans la graisse, se dépose en fins granules dans les travées protoplasmiques. (Pl. XIV, fig. 4, 5, 6.)

On peut suivre également sur les coupes l'hypertrophie des capillaires, qui constituent d'abord un réseau saillant à la surface de l'ovule, et bourgeonnent ensuite des diverticules qui s'insinuent dans la profondeur de l'ovule en même temps que l'assise folliculaire elle-même. Dubuisson (1903) émet l'opinion que le pigment accumulé dans les phagocytes pourrait être dérivé de l'hémoglobine d'hématies entraînées ainsi jusque dans la profondeur de l'ovule. L'interprétation me semble sujette à caution, car le processus d'hypertrophie vasculaire étant le même chez toutes les espèces de Batraciens, la formation de pigment est au contraire très variable de l'une à l'autre, et nulle chez le triton marbré. Chez certaines espèces de Batraciens, dont les œufs

pondus ont au moins un hémisphère très pigmenté, une partie du pigment des phagocytes doit avoir été englobé directement sous cette forme, au début de la résorption. Ultérieurement, on peut supposer que le pigment est un produit de déchet résultant de la digestion des substances de l'ovule, sans rapport forcé de dérivation avec l'hémoglobine; son apparition correspond à une propriété physiologique générale de l'animal : telle espèce fabrique du pigment dans ses cellules; telle autre n'en fabrique pas[1].

Qu'il y ait ou non formation de pigment, la graisse est, dans tous les cas, un des produits principaux résultant de la digestion des tablettes vitellines à l'intérieur des phagocytes folliculaires, et l'accumulation des gouttelettes grasses à l'intérieur de ces cellules les distend bientôt jusqu'à une taille considérable (60 μ de diamètre). Dans les cas que j'ai examinés, la résorption des ovules, avec transformation du vitellus en graisse, se produit, pour la grande majorité d'entre eux, exclusivement à leur périphérie et progressivement. Au fur et à mesure de l'englobement et de la digestion du vitellus, la couche des phagocytes folliculaires qui cernent l'ovule se resserre; il en résulte immédiatement que ces cellules, ayant à se répartir sur une moindre surface, chevauchent de plus en plus les unes sur les autres, et s'empilent en plusieurs épaisseurs (fig. B du texte). C'est le moment où s'accuse au maximum la pénétration profonde des bourgeons vasculaires.

La partie centrale, non encore englobée, de l'ooplasme se réduit progressivement et finit par disparaître. L'ovule n'est plus alors représenté que par un amas globuleux, encore peu cohérent, de phagocytes bourrés de graisse, et contenant encore, surtout dans la région centrale, quelques globules vitellins, qui ont été les derniers à être englobés et que la digestion n'a pas encore transformés. Ceux-ci sont digérés à leur tour, toujours par le même processus : l'amas des phagocytes ne contient plus alors que des gouttelettes grasses (pl. XIV, fig. 2). Celles-ci se résorbent à leur tour, et, au fur et à mesure que les phagocytes diminuent de volume par cette résorption, leurs rapports deviennent plus intimes, plus cohérents; entre eux apparaissent

1. La formation de pigment brun est en particulier très accusée chez la rainette, *Hyla arborea*, L.

quelques fibrilles, et bientôt ils constituent un petit noyau de tissu conjonctif (pl. XIV, fig. 3). Les bourgeons capillaires hypertrophiés subissent une régression concomitante, si bien qu'après la résorption complète de la graisse, le petit massif conjonctif,

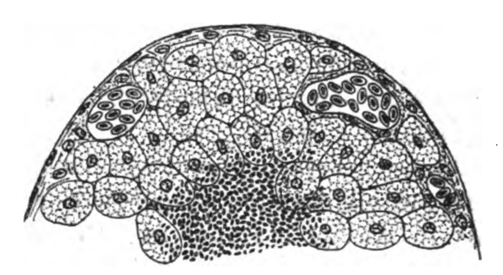


Fig. B.

à noyaux serrés entre des mailles de fibrilles, qui représente la trace d'un ovule résorbé, ne manifeste plus en rien une irrigation sanguine exagérée.

Les figures 4 à 6 de la planche XIV, relatives au triton palmé, représentent trois stades successifs de l'atrophie d'un ovule dans le cas où la résorption est accompagnée de la formation d'un pigment insoluble dans la graisse. Au fur et à mesure que la graisse elle-même se résorbe, et que les mailles du cytoplasme se resserrent, les granules pigmentaires se tassent et se confondent, si bien que les ovules sont finalement remplacés par des massifs conjonctifs, extrêmement obscurs, reconnaissables à l'œil nu dès la dissection.

Il est digne de remarque que les ovules très jeunes ne sont pas résorbés, et se présentent avec leur aspect parfaitement normal chez des femelles soumises à un jeûne complet depuis sept mois; ce sont les ovules prêts à être pondus, c'est-à-dire les cellules les plus strictement spécialisées qui sont les premières atteintes par l'atrophie. Mais des ovules peuvent aussi être résorbés, qui étaient en voie de croissance sans avoir atteint toute leur taille, et dont le cytoplasme n'était pas encore chargé des tablettes vitellines elliptiques qui caractérisent les ovules au voisinage de la maturité. Dans ce cas, la résorption des petits granules de l'ooplasme donne naissance à la formation dans les phagocytes de sphérules éosinophiles plus ou moins volumineuses. C'est là un détail dans les manifestations figurées

des phénomènes de digestion intracellulaire qui nous occupent; il ne me semble point y avoir lieu d'y voir avec Dubuisson un mode spécial d'atrophie. J'ajouterai que je n'ai trouvé dans mes préparations aucun exemple d'un autre mode, annoncé par cet auteur, de dégénérescence des ovules par confluence des globules vitellins en masses volumineuses, et auquel les phagocytes n'auraient aucune part, au moins au début. Je n'ai pu observer au contraire que des résorptions phagocytaires, se produisant, comme on a vu, de proche en proche à la périphérie de l'ovule, soit encore se produisant simultanément dans toute sa masse, par immigration de phagocytes dans sa profondeur. C'est ce dernier cas qui va nous occuper maintenant.

A un stade très précoce de la résorption d'un ovule, quelques cellules folliculaires peuvent se détacher de l'assise périphérique, et s'insinuer dans le cytoplasme ovulaire. Il n'est guère tout d'abord possible d'apercevoir que leurs noyaux, qui semblent perdus au milieu des granules vitellins, laminés entre eux de manière à prendre des formes rameuses, étoilées, extrêmement irrégulières. La limite du protoplasme du phagocyte est fort difficilement discernable; elle ne le devient qu'un peu plus tard, lorsque le phagocyte, ayant englobé un nombre considérable de granules, a repris une forme globuleuse et s'est en quelque sorte ramassé sur lui-même (pl. XIV, fig. 7). Ces phénomènes sont assez analogues à ceux que j'ai signalés dans la résorption phagocytaire des cellules adipeuses chez les fourmis (Ch. Pérez, 1902, p. 278, et pl. XI, fig. 14 et 15).

A l'intérieur de ces phagocytes libres, comme à l'intérieur des phagocytes relativement fixes de l'assise périphérique, la digestion du vitellus donne naissance à de la graisse; mais cette dernière se présente généralement sous forme de gouttelettes très petites et très nombreuses, qui, après fixation aux liqueurs osmiques, obscurcissent complètement la cellule, et cachent généralement le noyau (pl. XIV, fig. 8). Au contraire, après fixation au sublimé par exemple, on peut voir facilement le noyau au milieu des tablettes vitellines englobées (fig. 9), ou au centre d'un réticulum protoplasmique rendu apparent par la dissolution de la graisse (fig. 10). Le noyau est généralement alors moins irrégulier qu'au début de l'immigration, et peut même

avoir tout à fait repris au repos sa forme globuleuse ; on en observe un certain nombre en voie de division indirecte.

C'est à ce moment, où les progrès de la résorption ont fait en quelque sorte apparaître des jours dans la dense accumulation des granules vitellins, et où les phagocytes immigrés commencent à se montrer mieux circonscrits et mieux individualisés, que l'on peut les reconnaître sans le moindre doute pour des cellules folliculaires mobilisées. C'est du moins le cas pour la plupart d'entre eux. Mais on constate aussi que l'hypertrophie signalée plus haut des capillaires sanguins est accompagnée d'une diapédèse très notable de leucocytes, dont les uns, reconnaissables pour des éosinophiles, ne fonctionnent point comme phagocytes (pl. XIV, fig. 11), tandis que d'autres, dont le noyau est généralement plus multilobé, englobent des granules vitellins, et les digèrent avec formation de graisse (fig. 12). Il faut toutefois remarquer que cette phagocytose leucocytaire, qui n'intervient qu'en seconde instance, a un rôle bien moins important que la phagocytose par les cellules fixes ou libérées du follicule. Dans le cas, déjà examiné, où la résorption de l'ovule aboutit à la constitution d'un petit massif conjonctif, on peut retrouver dans ce massif un certain nombre de noyaux, reconnaissables pour des noyaux de leucocytes, et qui appartiennent sans doute à quelques-uns de ces phagocytes, essentiellement migrateurs, qui se seraient fixés au milieu des anciennes cellules folliculaires.

J'ai décrit successivement, dans ce qui précède, la résorption des ovules par le follicule périphérique, et par les cellules dissociées de ce follicule. Mais il faut bien concevoir que ce ne sont point là deux cas irréductiblement distincts; en fait, on observe tous les degrés dans la participation au processus atrophique des phagocytes libérés et des cellules restées en place du follicule.

Il me reste à décrire un cas relativement exceptionnel, et qui se présente d'une manière sporadique pour quelques ovules, chez tous les individus examinés de triton marbré. Tandis que, pour la très grande majorité des ovules, la résorption aboutit à la constitution d'un petit noyau conjonctif, pour quelques-uns, elle aboutit au contraire à la formation d'un kyste aqueux volumineux, pouvant atteindre jusqu'à 3 millimètres de diamètre, et

dépassant en tout cas d'une manière assez sensible le volume normal des ovules prêts à être pondus. Si je n'ai pu déterminer la raison de cette particularité, j'ai du moins observé les différents stades de la formation de ces kystes, et il est facile de décrire en quelques mots ce processus.

Il débute par l'immigration profonde de phagocytes, telle qu'elle vient d'être caractérisée : une majorité d'éléments folliculaires, une minorité de leucocytes. Mais au lieu que les cellules folliculaires restées en place empiètent de plus en plus sur l'ovule, elles vont cesser bientôt leur rôle phagocytaire et se borner à digérer les globules vitellins qu'elles ont englobés tout au début; ce sont au contraire les phagocytes libres, immigrés dans la masse de l'ovule, qui vont presque à eux seuls le résorber complètement. Tout d'abord leurs noyaux sont laminés, comme on l'a vu, entre les granules vitellins; puis à mesure que la résorption progresse, des vides apparaissent qui permettent de mieux voir les limites des phagocytes bourrés; ces vides sont occupés par un liquide parfaitement hyalin, qui ne donne naissance, dans les matériaux fixés, à aucun coagulum. A un moment où la résorption est déjà assez avancée, on peut remarquer que les globules vitellins non encore englobés flottent irrégulièrement éparpillés dans le liquide hyalin qui remplit l'ovule, et qu'ils sont au contraire agglomérés en atmosphère extrêmement dense tout autour des phagocytes; ceux-ci bien manifestement les captent en grand nombre et simultanément par toute leur surface (fig. C du texte), et rappellent tout à fait, après l'englobement, l'aspect des phagocytes bourrés d'inclusions, tels qu'on peut les observer par exemple dans la métamorphose des Insectes (*Körnchenkugeln*, *sphères de granules* des auteurs). La digestion des inclusions à l'intérieur de ces cellules donne naissance, comme on l'a vu, à de très petites gouttelettes grasses.

Au fur et à mesure que la digestion du vitellus s'opère par l'action des phagocytes immigrés, l'assise folliculaire achève elle-même de digérer les tablettes vitellines qu'elle avait englobées. Ses cellules, bourrées de volumineuses inclusions grasses, font d'abord saillie comme des papilles vers l'intérieur de la cavité qui a remplacé l'ovule (pl. XIV, fig. 13). Ultérieurement, la graisse est elle-même résorbée; ses gouttelettes diminuent de volume et de nombre, en même temps qu'augmente la quantité

de liquide sécrété dans la cavité de l'ovule; l'assise folliculaire se distend de plus en plus, ses cellules s'aplatissent en surface, et les gouttelettes grasses s'y orientent en une seule assise tangentielle (fig. 14 et 15). Au terme de cette évolution, l'assise folliculaire dont toutes les inclusions grasses ont achevé de disparaître, et dont les cellules étalées ont de plus en plus diminué d'épaisseur dans le sens radial, ne forme plus qu'une

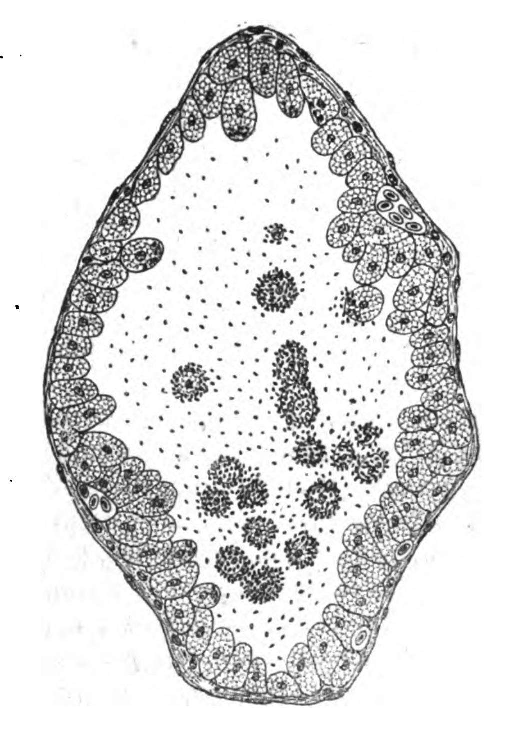


Fig. C.

mince pellicule tendue, limitant une sorte de phlyctène de liquide parfaitement hyalin. Dans ce liquide, flottent des phagocytes, encore bourrés d'inclusions grasses colorées, et généralement agglomérés d'une manière lâche en un seul massif (fig. D, du texte).

Il peut arriver qu'un certain nombre de phagocytes immigrés subissent une dégénérescence chromatolytique (pl. XIV, fig. 16); mais il m'a paru que c'était là un fait exceptionnel. Le rôle de ces cellules ne se borne pas, comme le dit, sans beaucoup

de précision RUGE, à liquéfier le vitellus, puis à disparaître elles-mêmes. Le plus généralement, les phagocytes gardent, jusqu'après digestion complète de leurs inclusions, un noyau parfaitement normal, et ils persistent, comme on l'a vu, flottant dans le liquide

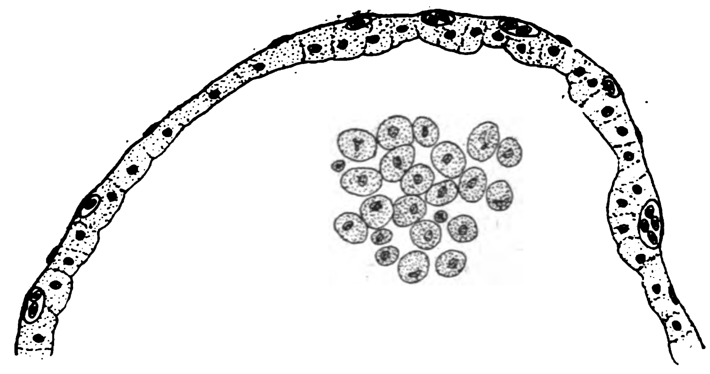


Fig. D.

d'un kyste ou sous forme d'éléments constituants d'un petit massif conjonctif.

Enfin, je crois avoir à peine besoin de relever l'opinion erronée de RUGE (1889, p. 519, 522) d'après laquelle la pénétration même des granules vitellins jusqu'au voisinage du noyau des cellules folliculaires serait un premier indice de la dégénérescence de ces éléments : leur membrane, atteinte dans son intégrité, ne serait plus seulement perméable aux liquides, mais se laisserait encore traverser par des éléments figurés assez volumineux. Il s'agit au contraire bien évidemment ici d'un englobement amœboïde des tablettes vitellines par des cellules folliculaires vivantes, en parfait état d'intégrité, et fonctionnant comme des phagocytes tout à fait caractérisés.

En résumé, le jeûne forcé est un moyen particulièrement commode de provoquer chez les Batraciens une importante résorption des ovules en voie de maturation. Tandis que les ovules très jeunes restent inaltérés, les ovules suffisamment évolués sont phagocytés par les cellules de leur follicule, auxquelles se joignent quelques leucocytes. Ce processus constitue un exemple particulièrement net de l'atrophie des cellules d'une catégorie spécialisée dans un organisme, et de leur

remplacement phagocytaire par des cellules conjonctives indifférenciées. Les phagocytes sont ici les cellules par l'intermédiaire desquelles les ovules sont normalement nourris; il est intéressant de voir se renverser des rôles que l'on pourrait croire inéluctablement prédéterminés dans l'organisme. Une autre circonstance mérite aussi d'être notée dans cette résorption. Généralement, c'est dans une même cellule que, par deux processus inverses, une substance de réserve s'élabore et s'accumule, puis est ultérieurement digérée pour être remise en circulation. Dans le cas actuel, au contraire, le cytoplasme ovulaire, où se sont élaborées les réserves vitellines, se montre ensuite incapable de les liquéfier à nouveau. Ce sont des cellules étrangères qui interviennent pour les englober et les digérer, et le processus n'est pas sans analogie avec la digestion intracellulaire des réserves vitellines dans le développement embryonnaire des Batraciens.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

Beddard F. E., The ovarian ovum of *Lepidosiren* (*Protopterus*). *Zool. Anzeiger*, 1886.

Von Brunn A., Die Rückbildung nicht ausgestossener Eierstockseier bei den Vogeln. — *Beiträge zur Anatomie und Embryologie als Festgabe für Jakob Henle*, Bonn, 1882.

Dubuisson, Dégénérescence normale des ovules non pondus, *C. R. Acad. Sc.*, Paris, 1903.

Henneguy L. F., Recherches sur l'atrésie des follicules de Graaf, *Journal de l'Anat. et de la Physiol.*, 1894.

Metchnikoff E., Revue de quelques travaux sur la dégénérescence sénile, *Ann. Biolog.* pour 1897.

Mingazzini P., Corpi lutei veri e falsi dei Rettili, *Ricerche fatte nel Labor. di Anat. normale d. R. Universita di Roma*, III, 2, 1893.

Pérez Ch., Contribution à l'étude des métamorphoses, *Bulletin scient. France et Belgique*, 37, 1902.

Perez Ch., Sur la résorption phagocytaire des ovules par les cellules folliculaires sous l'influence du jeûne, chez le triton, *Réunion biol. de Bordeaux*, 1903.

Ruge G., Vorgange am Eifollikel der Wirbelthiere, *Morph. Jahrbuch*, 15, 1889.

LÉGENDE DES FIGURES DANS LE TEXTE

Fig. A. — Région périphérique d'un ovule mûr normal.

Fig. B. — Stade avancé de la résorption d'un ovule.

Fig. C. — Début de la formation d'un kyste; les cellules folliculaires libérées captent par toute leur surface des globules vitellins.

Fig. D. — Stade avancé de la formation d'un kyste; un amas de phagocytes flotte dans le liquide.

EXPLICATION DE LA PLANCHE XIV

Grossissement commun à toutes les figures = 350.

Fig. 1. — *Molge marmorata.* Hypertrophie des cellules folliculaires et début de la résorption du vitellus à la périphérie d'un ovule. Sublimé. Carmin chlorhydrique; picro-indigo carmin.

Fig. 2 et 3. — Deux stades successifs de l'évolution du massif conjonctif qui remplace un ovule atrophié; résorption progressive de la graisse et apparition des fibrilles conjonctives. Liquide platino-osmique de Borrel, rouge magenta, picro-indigo carmin.

Fig. 4, 5 et 6. — *M. palmata.* Trois stades successifs de la résorption d'un ovule et de la condensation du pigment dans les cellules du massif conjonctif. Sublimé.

Fig. 7. — *M. marmorata.* Phagocytes folliculaires immigrés dans le vitellus. Sublimé.

Fig. 8. — Phagocytes bourrés de gouttelettes grasses résultant de la digestion des globules vitellins. Liq. de Borrel.

Fig. 9 et 10. — Phagocytes folliculaires à divers stades de la digestion; Sublimé.

Fig. 11. — Leucocyte éosinophile.

Fig. 12. — Leucocytes polynucléaires participant à la phagocytose.

Fig. 13, 14 et 15. — Trois stades successifs de l'évolution du follicule dans le cas où un ovule est remplacé par un kyste aqueux : résorption progressive de la graisse et distension en surface des cellules folliculaires. Liq. de Borrel.

Fig. 16. — Phagocytes folliculaires dont le noyau a subi la chromatolyse.

LEVURE DE BIÈRE ET SUPPURATION

PREMIER MÉMOIRE

PAR M. EDMOND SERGENT

La levure de bière, prise par ingestion, est utilisée depuis longtemps, par les empiriques de certaines contrées, contre diverses maladies cutanées. Son emploi dans la pratique médicale s'est beaucoup répandu en France, depuis la communication de Brocq[1].

L'effet thérapeutique de la levure de bière sur les lésions suppuratives de la peau est indiscutable, mais sous les réserves suivantes : 1) Elle ne constitue pas un remède héroïque; seules, les suppurations légères, n'intéressant que l'épiderme ou une faible partie du derme, sont influencées par son administration. Le furoncle représente le type des petits abcès que modifie heureusement le traitement par la levure de bière. Or le furoncle est par lui-même une lésion infime, en dehors des cas où il devient grave parce qu'il traduit un mauvais état général, comme dans le diabète, ou parce que sa situation sur les lèvres ou les narines peut faire craindre une embolie microbienne cérébrale. Le trouble apporté dans la santé générale de l'homme par un furoncle n'est pas en rapport avec l'altération anatomique, et résulte de la sensibilité aigüe qu'ont acquise nos nerfs cutanés. Les suppurations abondantes ne semblent pas être influencées par l'administration de la levure. 2) Toutes les personnes ne sont pas également sensibles à l'action de la levure. Chez un grand nombre de malades, celle-ci n'apporte aucune modification dans l'évolution des furoncles.

Pour étudier expérimentalement l'action de la levure sur les suppurations, nous avons dirigé d'abord nos recherches sur l'effet de la levure sur les animaux infectés par le staphylocoque doré, microbe habituel du pus des furoncles. Il fallait d'abord obtenir chez les animaux d'expérience une lésion comparable au furoncle de l'homme. L'inoculation sous-cutanée chez le lapin d'une cul-

1. *Presse médicale*. La Levure de bière dans la furonculose, 28 janv. 1899, n° 8, p. 45.

ture de staphylocoque donne un énorme abcès, qui s'ouvre largement, occasionnant un grand délabrement des tissus, et les animaux meurent cachectiques au bout de quelques semaines. L'inoculation sous-cutanée de staphylocoque chez le lapin est trop sévère pour servir à l'expérimentation ; car la levure, chez le lapin comme chez l'homme, n'est pas un médicament héroïque, de même qu'elle n'agit pas avec une efficacité égale chez tous les individus.

Le mode d'inoculation que nous avons adopté consiste à frictionner la peau d'un lapin avec une culture de staphylocoque. Nous choisissons un lapin à peau fine et non bourrée : les lapins tout noirs ou tout blancs conviennent habituellement[1]. Nous rasons ou épilons une partie du dos du lapin, nous laissons tomber sur la peau nue quelques gouttes d'une culture en bouillon de staphylocoque, que nous étalons avec une lame porte-objet flambée. Cette lame érode légèrement les strates superficiels de l'épiderme; elle ne doit pas atteindre les vaisseaux du derme, car s'il y a du sang extravasé à la surface de la peau, l'inoculation n'a aucune suite.

Deux jours après la friction, on voit apparaître sur la peau de l'animal un grand nombre (40 à 100) de petites bulles purulentes grosses comme une tête d'épingle. Le 3e jour, les bulles se sont développées et sont auréolées de rouge. Le 4e jour, elles commencent à sécher, et le 5e ou le 6e jour, la desquamation est complète[2].

Nous avons déterminé ensuite le mode d'administration de la levure. Il était tout indiqué de la donner aux animaux d'expérience *per buccam*. Déjà Mac Nair Scott avait employé ce procédé, mais avec un insuccès complet, dû certainement à ce qu'il donnait trop peu de levure à ses lapins (1 à 3 grammes par jour)[3].

1. Lorsque la peau des lapins est revêtue, au-dessous des poils, d'un duvet fin (bourre), cette peau est très épaisse; les staphylocoques y cultivent d'une façon bien plus intense que sur une peau simplement couverte de poils, et l'action du traitement par la levure est *nulle*. On peut considérer que les staphylocoques cultivent dans les couches cornées de cette peau épaisse comme en dehors de l'organisme.

2. Nous nous sommes servi d'un staphylocoque virulent, provenant de la collection de M. Binot.

3. R. J. Mac Nair Scott. Notiz über eine Experimentaluntersuchung über die gegenseitige Wirkung zwischen Staphylococcus aureus und Hefe, *Centralbl. f. Bakt.*, t. XXVIII, pp. 420-421, nos 14-15, 15 octobre 1900.

La quantité optima que nous avons employée était de 20 à 30 c. c. *pro die* d'une suspension épaisse de levure[1]. Nous n'avons pas utilisé la sonde œsophagienne. La levure était donnée aux lapins avec une seringue de 10 c. c., dont l'extrémité était introduite dans la bouche, par l'espace libre laissé entre les incisives et les molaires par l'absence de canine chez les rongeurs. On évite facilement d'envoyer des levures dans le larynx. Des doses plus fortes amènent du ballonnement du ventre et de la diarrhée, et chez les lapins ainsi affaiblis, l'action de la levure sur le staphylocoque est nulle.

Pour se mettre dans les mêmes conditions que dans la pratique humaine, la levure fut, en premier lieu, donnée curativement. On commençait à l'administrer aussitôt que les bulles purulentes apparaissaient, c'est-à-dire le 2e jour après la friction avec la culture de staphylocoque. Dès le lendemain, les bulles purulentes du lapin traité commençaient à sécher, tandis que c'était le moment où celles du lapin témoin étaient le plus grosses. Le 4e jour après la friction, les bulles du traité se desquamaient, tandis que celles du témoin commençaient à peine à se flétrir.

Les résultats sont encore meilleurs si l'on donne la levure préventivement. Il suffit de commencer le traitement 24 heures avant la friction, et de le continuer tous les jours. On ne voit alors se produire que quelques petites bulles, qui sèchent en quelques heures, tandis que les témoins n'ont jamais moins d'une quarantaine de bulles, évoluant en 2 à 3 jours.

L'action de la levure est très fugace. Ainsi, on peut faire prendre de la levure à un lapin pendant 8 ou même 15 jours, si on suspend ce traitement 24 heures avant la friction, l'éruption n'est aucunement modifiée. Pour être efficace, le traitement doit être continu.

Les différents modes d'inoculation de la levure dans le corps des lapins ne nous ont pas paru praticables. Les levures inoculées dans les veines tuent presque toujours le lapin subitement. D'autre part, nous n'avons jamais vu se résorber les levures inoculées dans le péritoine ou sous la peau. Ramon Turro, Tarruella et Alvaro Presta, qui inoculent 10 c. c. de

1. Nous nous sommes servi d'une levure de bière pure, fournie obligeamment par M. Fernbach, et surtout de la levure de boulangerie que l'on trouve dans le commerce en pains comprimés, où elle est presque pure.

levures sous la peau de lapins, d'ailleurs sans résultat *clinique* appréciable, ne disent pas exactement ce que deviennent ces levures [1]. Dans nos expériences, les levures inoculées sous la peau de lapins, loin de se résorber, donnaient lieu à la production de tumeurs bosselées, grossissant sans cesse. Au bout de quelques mois, une de ces tumeurs est devenue plus grosse que la tête du lapin.

Si l'on ouvre une de ces tumeurs, on trouve, enkystée dans une sorte de membrane pyogénique, une masse caséeuse blanche semblable à du mastic, composée de levures non altérées, auxquelles sont mêlées presque toujours des bactéries mobiles, venues très probablement de l'intestin de l'animal par les vaisseaux. Cette non-résorption des levures injectées en certaine quantité dans le péritoine ou sous la peau de lapins a d'ailleurs été déjà signalée (Hédon [2]).

Le sérum de ces lapins porteurs de grosses tumeurs à levures s'est montré fortement agglutinant pour une culture de staphylocoques, tandis que le sérum de lapin neuf est très faiblement agglutinant pour ces microbes. Le sérum des lapins porteurs de tumeurs à levures n'est pas bactéricide pour les staphylocoques.



Nous avons essayé d'extraire de la levure le principe qui agit contre le staphylocoque dans les expériences précédentes. Le procédé d'extraction le plus simple, la macération dans l'eau, nous a réussi. Nous tuons les levures par un séjour de 24 heures dans de l'alcool absolu, nous enlevons l'alcool par la filtration sur un essorateur, puis en mettant la levure à sécher à l'étuve à 37°, entre deux feuilles de papier stérile. La levure sèche est mise à macérer pendant deux jours dans deux parties d'eau de conduite stérilisée. L'eau de macération est filtrée sur l'essorateur, puis sur bougie Chamberland ; on obtient un filtrat citrin, à odeur et à saveur végétales.

Dans les expériences que nous avons faites jusqu'ici, nous avons administré cet extrait de levure aux lapins seulement *per*

1. Ramon Turro, J. Tarruella, Alvaro Presta, La levadura de cerveza en las estafilococias y estreptococias experimentales : *Gaceta medica catalana*, mars 1903, 7 p. Reproduit dans *Centralbl. f. Bakter., I, Origin.*, t. XXXIV, n° 1, pp. 22-28.

2. Hédon, Serum agglutinant des levures. *Soc. Biologie*, 9 mars 1901, p. 256.

buccam, à la dose de 50 à 80 c. c. qui ne leur cause aucun trouble. Les résultats ont été exactement les mêmes que ceux qui avaient été obtenus avec la levure en nature, que nous rapportons plus haut.

Il faut ajouter que cet extrait de levure, donné à plusieurs personnes souffrant de furoncles, a agi exactement comme la levure en nature : le symptôme douleur a disparu le premier, puis les ganglions ont diminué de volume, se sont résorbés ; les furoncles déjà ouverts se sont vidés très vite, ceux qui étaient à la période inflammatoire ont avorté, en laissant comme trace une rougeur non douloureuse qui a persisté quelques jours. Comme la levure en nature, l'extrait de levure a échoué complètement chez quelques personnes.

L'intérêt de l'emploi, chez l'homme, d'un extrait aseptique de levure nous paraît résider en son innocuité certaine.

Ne peut-on pas craindre, en effet, l'ingestion de levures *vivantes*, comme le sont même les levures sèches, en poudre, du commerce ? Les observations de maladies humaines dues à des levures deviennent de plus en plus nombreuses. Les levures qui ont servi à San Felice pour produire des tumeurs malignes avaient été prises par lui sur la peau de fruits comestibles. Il n'est peut-être pas indifférent d'introduire dans notre intestin des quantités énormes de levures vivantes, dont le nombre n'est pas à comparer avec celui des quelques levures que nous absorbons avec le vin ou la bière.

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES
Sur l'inoculation de la syphilis au singe (bonnet chinois).

Par le Dr C. NICOLLE,
Directeur de l'Institut Pasteur de Tunis.

Dans la communication présentée par eux à l'Académie de médecine [1] sur l'inoculation du virus syphilitique aux singes anthropoïdes, MM. Metchnikoff et Roux ont fait allusion à des expériences de même ordre que j'ai pratiquées antérieurement sur des singes appartenant à une espèce moins voisine de l'homme.

Ces recherches, que je pensais poursuivre, sont restées jusqu'à présent inédites, comme le sont restées également les recherches antérieures de mon frère, le Dr Maurice Nicolle, sur le même sujet Aujourd'hui que les travaux de mes deux maîtres ont fait de l'inoculation de la syphilis aux animaux une question toute d'actualité, je crois qu'il n'est pas sans intérêt de publier les résultats auxquels je suis parvenu.

Mes expériences ont été pratiquées dans mon laboratoire de Rouen ; le virus syphilitique qui a été utilisé pour les inoculations provenait du service que je dirigeais alors à l'Hospice général de cette ville. J'ai été très utilement aidé dans mon travail par mon ami et collègue le Dr Derocque, qui a bien voulu mettre à ma disposition son habileté chirurgicale et prélever chez mes malades le matériel nécessaire aux inoculations. Je le remercie de son concours qui a été, dans l'espèce, une collaboration véritable.

Mes expériences sont au nombre de trois. Entre les diverses espèces de singe de petite taille sur lesquelles je pouvais opérer, j'ai donné la préférence au *bonnet chinois*. Cette espèce s'était montrée, entre mes mains, la plus sensible à l'inoculation d'une autre maladie vénérienne, regardée, elle aussi, comme spéciale à l'homme, le chancre mou [1].

Expérience I. — M... Louis, 19 ans, entré dans le service le 5 septembre 1900, pour chancre induré du prépuce datant de trois semaines, avec adénopathie primitive inguinale gauche.

1. *Bulletin de l'Académie de Médecine*, séance du 28 juillet 1903, p. 101.
2. *Soc. de Biologie*, séance du 7 octobre 1899 ; *Presse médicale*, n° du 4 novembre 1899, p. 265.

Le 7 *septembre*, à 9 heures 1/2 du matin, excision du chancre par le Dr P. Derocque. Le même jour à 10 heures 1/2, un singe bonnet-chinois femelle est inoculé par frottis de ce chancre sur la région frontale, préalablement scarifiée.

Les lésions d'inoculation sont entièrement disparues au bout de trois jours.

Le 22 *septembre, après une incubation de* 15 *jours*, apparaissent sur la région inoculée *six à huit papules*, de couleur rouge-sombre, ayant les dimensions de deux têtes d'épingle, légèrement saillantes. La peau est très légèrement indurée à leur niveau. Aucune hypertrophie des ganglions lymphatiques correspondants.

Le 25 *septembre*, les papules sont devenues un peu plus grosses, leur sommet présente une excoriation très superficielle.

Le 27 *septembre*, toute trace d'excoriation a disparu, il se produit une légère desquamation au niveau des papules.

Le 30 *septembre*. Disparition complète des lésions, il ne reste plus d'appréciable que la desquamation. *La guérison des accidents s'est faite en* 10 *jours*.

Le singe observé pendant un an environ n'a présenté ultérieurement aucun autre symptôme.

Expérience II. — D... Gabriel, 22 ans, entré dans le service le 21 décembre 1901, pour chancre induré du prépuce remontant à 15 jours, avec adénopathie inguinale gauche énorme datant de 3 jours.

Le 24 *décembre*, à 9 heures 3/4 du matin, le Dr Derocque pratique l'excision du chancre et enlève également les ganglions inguinaux. Le même jour, à 11 heures, inoculation d'un singe bonnet chinois mâle en trois régions :

1° Dans le tissu cellulaire du prépuce. Deux inoculations sont faites, l'une à gauche, l'autre à droite, avec 1 c. c. de bouillon dans lequel ont été broyés des débris de chancre et d'un ganglion ;

2° A la région frontale gauche. La peau est rasée avec un rasoir dur et frottée ensuite à plusieurs reprises avec un fragment de ganglion ;

3° A la région frontale droite. La peau est scarifiée et frottée ensuite avec des débris du chancre et d'un ganglion.

La réparation des lésions d'inoculation s'est faite rapidement. En 3 jours, la peau du front reprend son aspect ordinaire. Le prépuce qui s'était d'abord œdématié redevient normal en 5 à 6 jours. Le 1er janvier, il ne reste plus trace des lésions opératoires.

Le 12 *janvier, après une incubation de* 19 *jours*, paraissent simultanément les accidents suivants :

1° Au niveau du prépuce. Dans l'épaisseur du tissu cellulaire et du côté gauche seulement, se montre un *noyau dur*, élastique, du volume et de la forme d'une petite lentille, indolore, ne s'accompagnant d'aucun changement de coloration des téguments. *Les ganglions de l'aine du côté droit sont manifestement augmentés de volume, ceux du côté gauche le sont un peu moins*, leur pression paraît indolore ;

2° Sur la région frontale gauche sont apparues 5 *papules* saillantes, ayant exactement les dimensions et l'aspect notés dans la précédente observation. A leur niveau, la peau est légèrement indurée ;

3° Sur la région frontale droite, *une papule* unique, semblable, mais de dimensions doubles. Aucune hypertrophie des ganglions correspondants.

Les *jours suivants*, même état.

Le 16 *janvier*. Les papules frontales et le noyau du prépuce sont en voie de disparition.

Le 1er *février*. Disparition complète de ces lésions; il ne reste plus qu'une desquamation légère de la région frontale. *La guérison des accidents s'est faite en 20 jours.*

Le singe observé pendant 6 mois environ n'a présenté aucun autre symptôme.

Expérience III. — V... Albert, 33 ans, entré dans le service le 4 juin 1902 pour deux chancres indurés du prépuce datant de 8 jours; le coït infectant remonte à 15 jours, il n'existe pas encore d'adénopathie primitive (celle-ci s'est montrée le 15 juin; le 30 est apparue la roséole).

Le 7 *juin*, à 9 heures 1/2 du matin, le Dr P. Derocque pratique l'excision du chancre. Le même jour à 10 heures 1/2, inoculation d'un singe bonnet chinois mâle. La peau du front est rasée avec un rasoir dur et l'inoculation est faite par frottis du chancre sur la peau, encore rouge du feu du rasoir [1]. En outre, un fragment du chancre est frotté pendant quelques instants à la surface de la conjonctive palpébrale de l'œil gauche.

Le lendemain même, il n'existe plus de traces des lésions d'inoculation.

Le 22 *juin*, *après une incubation de 15 jours*, apparition sur la région frontale d'un groupe de 6 *à* 8 *papules* de très petites dimensions; elles croissent pendant deux jours. Rien du côté de la conjonctive.

Le 25 *juin*, elles atteignent leurs dimensions maxima et se présentent alors sous forme d'éléments saillants, du volume de trois à quatre têtes d'épingle, à sommet couvert d'une petite squame. La peau est manifestement indurée à leur niveau. Aucune hypertrophie des ganglions lymphatiques correspondants. Les lésions ont été photographiées le jour même par notre collègue le Dr de Batz.

Le 30 *juin*, les papules sont en voie de disparition; la desquamation est plus marquée.

Le 15 *juillet*, il ne reste plus que quelques squames sur la région frontale. *La guérison des accidents s'est faite en 23 jours.*

Le singe n'a présenté ultérieurement aucun autre symptôme. Il est mort d'une suppuration non tuberculeuse de la région sous-maxillaire le 1er septembre. A l'autopsie, rien de spécial; la rate est un peu hypertrophiée et ferme. A noter que *les poils n'ont pas repoussé sur la région frontale.*

1. Je crois, en ce qui concerne le virus syphilitique, l'inoculation épidermique, ou en tout cas très superficielle, préférable à l'inoculation par scarification. Les lésions les plus manifestes obtenues dans mes expériences ont eu pour siège les régions préalablement rasées. N'y a-t-il pas lieu, d'ailleurs, de se rapprocher, dans l'expérimentation, des conditions dans lesquelles se fait l'infection naturelle; or chez l'homme la porte d'entrée du virus est, dans la grande majorité des cas, une érosion si superficielle qu'elle est méconnue.

L'inoculation épidermique a encore pour elle cet avantage de réduire, au minimum, le traumatisme opératoire.

En résumé, chez ces trois singes, l'inoculation de produits syphilitiques (chancres ou ganglions) a déterminé l'apparition locale d'éléments papulosquameux, et dans un cas seulement (obs. II) d'un noyau sous-cutané induré, accompagné d'une hypertrophie des ganglions correspondants. Ces accidents ont eu une évolution rapide (10 à 23 jours) ne laissant rien après eux, sauf dans un cas (obs. III) où une alopécie persistante a été notée. Chez aucun de ces trois singes, il n'a été observé d'accidents ultérieurs, analogues ou non aux symptômes de la période secondaire de la syphilis.

Ces lésions pourraient passer pour banales, si elles s'étaient montrées immédiatement à la suite de l'inoculation. Ce qui leur donne une signification réelle c'est *qu'elles ont paru après une période d'incubation de* 15 *à* 19 *jours*, se montrant en cela analogues à l'accident primitif de la syphilis chez l'homme.

Au moment où elles ont débuté, toute trace des lésions d'inoculation était entièrement disparue. Il n'y a donc pas lieu de rattacher leur apparition au traumatisme opératoire. D'ailleurs, à la même époque, j'ai inoculé à quatre singes de même espèce, dans les mêmes régions, et avec une technique identique, des produits provenant de molluscum contagiosum de l'homme; l'inoculation de ces produits a été négative et chez aucun des animaux inoculés, je n'ai vu apparaître, soit de suite, soit ultérieurement, la moindre lésion locale.

Il y a évidemment loin des accidents passagers présentés par ces animaux d'expérience à l'évolution de l'infection syphilitique chez l'homme. Je ne crois pas que cette différence autorise à nier la nature syphilitique des accidents observés. Je pense, au contraire, que le bonnet chinois doit être considéré comme n'étant pas absolument réfractaire à l'inoculation du virus syphilitique, et j'estime qu'il y aurait lieu de le conserver comme animal d'expérience pour l'étude de la syphilis.

La faible réceptivité qu'il présente pourrait, sans doute, être artificiellement augmentée ; d'autre part il est possible qu'après plusieurs passages par les singes anthropoïdes le virus syphilitique devienne plus actif pour le bonnet-chinois. Si cette hypothèse se trouvait réalisée, l'étude expérimentale de la syphilis en deviendrait plus facile.

Tunis, 1er octobre 1903.

ÉTUDES D'HYDROGRAPHIE SOUTERRAINE

PAR E. DUCLAUX

(*Suite*. V. p. 523.)

IV

ÉTUDES DES EAUX VOISINES D'OLMET

Pour relier les eaux de mon laboratoire à celles de la région, j'ai commencé par celles qui viennent sourdre à Olmet et dans le voisinage. J'ai dit qu'il y avait, à Olmet même, plusieurs sources dans la propriété. L'une d'elles, dite de la ferme, qui s'y abreuve et y lave son linge, jaillit à une hauteur d'environ 694 mètres. Elle est assez abondante, régulière, fraîche l'été et chaude l'hiver, comme du reste toutes celles que nous allons passer en revue. Une autre, plus abondante encore, sourd dans un pli de terrain, à 705 mètres, dans une sorte de bassin naturel où viennent aboutir quelques autres sourcettes. Celle que j'ai recueillie s'élève du fond d'une sorte de bassin artificiel. C'est la source du village d'Olmet. Une autre eau a été amenée dans la cour d'une propriété voisine par le propriétaire, M. Guibal, et y débouche par un orifice placé à 703 mètres. Le point de départ n'est pas beaucoup plus élevé. A ces eaux, dont les origines ne sont pas à plus de 100 mètres de la source du laboratoire, j'ai ajouté les eaux d'Aris, fontaine pérenne et très ancienne, qui compte dans les souvenirs du pays. Elle apparaît sur le flanc du chemin public, sous forme d'un filet peu abondant, mais variant peu de débit, à 1 kilomètre environ d'Olmet, à une hauteur de 700 mètres. De l'autre côté d'Olmet, à cette même distance d'environ 1 kilomètre, j'ai étudié aussi la source de Comblat-le-Pont, célèbre par son abondance. C'est la plus grosse du pays, elle a servi à alimenter un moulin : aujourd'hui elle sert à l'irrigation. L'orifice, qui semble avoir été déplacé par un éboulement, est à la cote de 697 mètres.

Pour toutes ces eaux, voisines, comme on le voit, du niveau 700 mètres, qui est le niveau d'Olmet, on a fait un certain nombre d'analyses dont voici les résultats, présentés dans la même forme que plus haut.

Nos d'ordre.	Origine.	Dates.	Temp^{re}.	Résidu.	Chaux.	Sel marin.
—	—	—	—	—	—	—
18	Eau de la ferme	5.IV.96	8,3	93	16	3,0
19	—	13.IX.96	9,8	104	19	3.0
20	—	8.X.99	10.4	93	16	3,0
21	—	1.VIII.03	9,4	104	16	2,0
22	Eau du village	5.IV.96	8,4	78	15	2.0
23	—	13.IX.96	9.2	90	8	3,0
24	—	25.IX.96	9.2	85	7	2,0
25	—	8.X.99	—	86	14	3,5
26	—	1.VIII.03	9,4	97	11	1,0
27	Source Guibal	5.IV.96	8,8	96	20	2,5
28	—	13.IX.96	10.0	115	11	2,5
29	—	8.X.99	10,0	112	28	3,0
30	—	1.VIII.03	9.8	106	16	2,5
31	Source d'Aris	10.VIII.95	9,7	112	21	3.0
32	—	10.X.95	9.6	95	14	3,0
33	—	10.IX.96	9,7	100	13	3.5
34	—	29.XII.96	—	79	22	3,5
35	—	14.IX.97	9,2	98	11	4.0
36	—	18.IX.98	9,6	86	19	3,0
37	—	8.X.99	9.8	92	21	3,0
38	—	1.VIII.03	9,4	98	11	3.0
39	Source de Comblat	13.IX.94	8,7	79	9	3.0
40	—	15.IV.95	8.6	71	7	3.0
41	—	28.IX.95	8.6	82	10	3,0
42	—	1.IV.96	8,6	76	7	3,0
43	—	2.X.96	8,6	75	5	2,0
44	—	29.XII.96	—	97	22	3.0
45	—	18.X.98	8.4	69	10	3,0
46	—	3.X.99	8,7	80	9	3.0
47	—	1.VIII.03	9,3	70	8	2.0

Étudions d'abord en gros l'ensemble des résultats. On voit reparaître le caractère des eaux du laboratoire. Aucune de ces sources n'a présenté deux fois de suite la même composition. Chacune a donc son individualité, et rien n'est moins en accord que la série de ces chiffres avec l'idée de voir dans ces sources la manifestation d'un même courant souterrain, qui reparaîtrait au jour quand il en trouve l'occasion. Il est certain que nous ne sommes pas ici dans le cas de ces rivières souterraines comme

on en a trouvé dans d'autres régions, et comme on peut en soupçonner au-dessous des coulées de basalte. Le sol ici est compact, et chaque source a son lit, qui diffère de celui de la source voisine en ce qu'il est plus ou moins étendu, et aussi fait d'un terrain différent.

L'étendue se révèle en gros par le volume de la source : la différence de nature par les différences de composition des eaux. Le bassin de la source de Comblat, qui vaut plusieurs centaines de fois la source d'Aris, est sûrement plus grand. Mais cette différence ne se traduit pas par une augmentation d'homogénéité, comme on pourrait le croire. Le rapport entre le maximum et le minimum est, en ce qui concerne le résidu, de 1,4 pour les deux sources; en ce qui concerne la chaux, il est de 2 pour Aris, de 4 pour Comblat, c'est-à-dire que c'est la source la plus abondante qui subit le plus de variations. D'un autre côté, chaque source a son caractère. La source de Comblat est, par exemple, moins chargée de sels que la source d'Aris ou celle de la ferme. Il faut donc se représenter chaque source se formant à part, et apportant à l'extérieur à la fois les caractères généraux du terrain dont elle sort, et les différences particulières du coin de terre où elle se prépare.

Température des sources.

Elle se personnifie par un autre élément : sa température. On s'est toujours préoccupé de cet élément et, depuis qu'on a appris à le mesurer avec précision, on sait que la température d'une source est à peu près la température moyenne de la région où elle sourd. Il y a quelques raisons d'accepter cette donnée, et ces raisons sont surtout bonnes pour un pays comme celui que nous étudions, où il n'y a pas de grands courants souterrains apportant de grandes sources de chaleur et de froid. La source s'alimente sur place, avec des filets d'eau qui ont au moins pénétré jusqu'à la couche où ne se manifestent plus les températures journalières, saisonnières et annuelles, et où les thermomètres marquent un point constant qui est par définition la *température moyenne du sol*. L'expérience montre que cette température du sol est très voisine de la température moyenne de l'air, telle que la relève une série suffisante d'observations, faites avec un bon thermomètre bien placé, et il est connu et

accepté que lorsqu'on n'a pas le loisir de faire de longues études, on peut se contenter de plonger un thermomètre dans l'eau d'une source pour connaître la température moyenne du lieu.

Les chiffres mentionnés dans le tableau montrent qu'on serait bien embarrassé si on les prenait au pied de la lettre. Ils ne sont d'abord constants pour aucune source, et pour quelques-unes les variations sont très sensibles. Cette remarque n'est pas encore faite pour nous désarçonner. Notre raisonnement n'est bon que si toutes les molécules d'eau de la source ont pénétré jusqu'à la couche de température constante du sol, et coulent avec une vitesse suffisante pour ne pas l'avoir perdue en arrivant à l'air. Tel n'est que rarement le cas. Il y a presque partout, se mélangeant aux eaux profondes, des eaux superficielles qui apportent l'écho des variations journalières. Dans les pays à sol poreux ou demi-poreux comme le Cantal, la végétation et la couche meuble qui la porte constituent une sorte d'éponge en nappe, dont les irrigations retiennent la provision d'eau, et qui se ressuient dans les sources. Parfois ces sources sont captées, c'est-à-dire qu'elles ont été amenées dans leur position actuelle dans des conduites superficielles, qui les mettent longuement en rapport avec la température ambiante, et il faut tenir compte de toutes ces causes d'erreur, en interprétant le chiffre que nous fournit aveuglément le thermomètre.

Faisons à ce point de vue la critique des diverses sources étudiées jusqu'ici. La source du laboratoire vient de 200 mètres, au travers de tuyaux de fonte, immergés à petite profondeur dans une prairie irrigable, et, malgré son abondance, elle peut subir pendant son trajet des variations de température pouvant atteindre 2 degrés. La source de la ferme est placée dans une situation si incommode qu'elle doit être naturelle. Mais une rigole d'irrigation la domine à quelques mètres et amène de l'eau deux jours par semaine. Cette eau peut arriver à la source, sans que j'aie pu m'en convaincre. La source du village d'Olmet sourd au pied d'un coteau irrigable, et, bien qu'elle soit très abondante, elle peut subir de ce fait des variations de température. La source Guibal, médiocre comme volume, traverse des tuyaux de poterie, que coupe l'eau du village sitôt qu'elle est employée aux irrigations. Pour toutes ces sources, la comparaison des observations d'hiver (2, 18, 22, 27) avec celles d'été de

la même année (5, 19, 23, 28), montre une différence qui est trop grande pour que nous puissions parler de température constante. Il faut conclure que ce sont des exceptions et qu'on aurait eu tort d'appliquer la règle usuelle.

La source d'Aris vaut beaucoup mieux. Il est curieux de voir se maintenir ainsi la température d'un aussi mince filet d'eau. C'est qu'ici l'émergence est naturelle, et n'est pas dominée par une autre source ni menacée par des irrigations. Elle est seulement sous le coup des infiltrations d'une grange à quelques mètres, et c'est ce dont avertit le chiffre relatif au chlorure de sodium, un peu plus grand que pour les sources voisines. Mais nous reviendrons sur ce point. Concluons pour le moment que, même pour cette source, la température moyenne ne serait connue qu'à un demi-degré près.

La source qui se présente dans les meilleures conditions apparentes pour l'étude est celle de Comblat-le-Pont, la plus volumineuse en même temps et la plus naturelle. Pour celle-ci, il y a une température moyenne, qui est de 8°,6, que le thermomètre relève presque constamment à 0°,1 près. Cette température est inférieure de 1° à celle d'Aris, et, si on veut choisir entre ces deux sources celle qui donne le vrai chiffre, on n'a d'autres raisons que des raisons de sentiment, qui sont ce qu'il y a au monde de moins scientifique. Concluons que la recherche de la température moyenne par les sources ne mérite qu'une confiance très limitée. Chaque source conserve sous ce point de vue sa petite personnalité.

V

ÉTUDE DES EAUX DU NIVEAU D'OLMET

Nous pouvons résumer sous une forme un peu schématique ce que nous venons d'apprendre en disant que toutes les sources que nous avons étudiées font partie d'une même famille, et, comme dans l'humanité, sans être différentes, ne sont pourtant pas identiques. Ceci nous pousse à rechercher si on retrouverait la même parenté entre les eaux de sources qui apparaissent sur le flanc gauche de la vallée de la Cère, au niveau de celles d'Olmet, et que nous avons déjà été conduits à envisager comme tributaires de la surface de séparation des couches calcaires et des terrains volcaniques. J'ai étudié pour cela toutes celles qui

avaient quelque importance, et je présente de la même façon les résultats de l'analyse. Je suis parti de Comblat en remontant la vallée.

A chaque source correspond le chiffre de son altitude, mesurée par le baromètre ou relevée sur les cartes de l'État-major.

Nos d'ordre.	Origine.	Alt.	Dates.	Tempre.	Résidu.	Chaux.	Sel marin.
—	—	—	—	—	—	—	—
48	Daysset (Prax)	686	16.IX.94	9,8	88	9	3.5
49	—	—	1.IX.95	9,8	89	10	3,0
50	—	—	14.IX.97	9,4	88	9	3.0
51	—	—	25.VIII.03	9,8	77	7	3,0
52	Maisonneuve	700	10.IX.95	9,0	88	7	2.0
53	—	—	30.III.96	8.9	86	10	2.0
54	—	—	15.IX.96	8.9	94	8	2,0
55	—	—	14.IX.97	9,0	90	9	2.0
56	Salvaroque	700	15.IX.96	9,6	65	5	2.0
57	Pré Tournier	700	14.IX.96	8,8	61	5	2,0
58	—	—	2.IV.97	8,0	64	5	3,0
59	Grand Hôtel (Vic)	700?	4.V.98	?	87	9	3,0
60	Salvagnac (Pré)	680	21.IX.94	8,4	72	18	2,0
61	—	—	30.III.96	?	76	8	2,0
53	—	—	16.IX.96	9,0	80	10	2,0
64	—	—	10.IX.99	8,4	80	10	2,0
65	Trémoulet	710	30.IX.96	9.0	112	10	2,5

Remarques. — 48 à 51. Fontaine-lavoir du village : réunion de 2 sources. captées à environ 200 mètres — 52 à 55. sort naturellement du pied d'un escarpement boisé. — 56. Fontaine-lavoir. — 57 et 58. Achetées par la Cie d'Orléans avec les autres sources du pré, et réunies après les travaux dans le no 59, où l'influence de la chaux du réservoir est peut-être sensible. — 60 à 64. Belle source jaillissant au milieu d'un pré qu'elle arrose, sert ensuite à nourrir les fontaines du village. — 65. En face du passage à niveau du chemin de fer.

On ne peut pousser plus loin les recherches en remontant la vallée. Trémoulet domine la coulée qui donne naissance au Pas de la Cère et qui en relève le lit de 40 mètres, laissant à moitié hauteur ce niveau de 700 mètres d'altitude. Au delà, il est sous le sol. Mais on peut le trouver en aval, et, en continuant à suivre sur la carte géologique la même ligne que tout à l'heure, de séparation des tufs d'andésite et des alluvions et moraines quaternaires et récentes, on trouve les villages ou propriétés suivantes, tous accolés à des sources puissantes.

Elles font suite en descendant à celles d'Aris.

Nos d'ordre	Origine. —	Alt. —	Dates. —	Tempre. —	Résidu. —	Chaux. —	Sel marin.
66	Clavières (route)	680	25.VII.03	11,0	120	13	3.5
67	Clavières (grange)	680	13.IX.96	10.2	104	16	3.5
68	La Gentie	690	20.IX.01	11.0	106	20	4.0
69	Marfons	690	7.IX.94	9.6	100	21	3.5
70	—	—	2.IX.96	9.4	100	13	3.5
71	Maruéjouls (place)	730	20.IX.94	9.0	110	22	3.5
72	Maruéjouls (pré)	730	1.IX.96	9,2	114	17	4.0
73	Esmons (route)	660	24.VIII.96	10.0	118	28	3,5

Remarques. — Le château de Clavières et ces villages ont de très belles eaux qui toutes, malheureusement, sont voisines de couches marneuses, ce qui amène des éboulements de terrain ou même de maisons. Nous nous sommes rapprochés en effet, en allant en aval, de la fin de la coulée. Les eaux de Maruéjouls, qui jaillissent au sommet d'un mamelon, doivent peut-être à cette circonstance leur niveau élevé et leur abond nce. La source de Marfons est aussi très forte. A Esmons, on est en plein calcaire, et je ne sais d'où est partie la source conduite sur la route.

Si nous collationnons maintenant tous ces résultats, nous voyons ceci :

1° Tout le long de la vallée les niveaux des sources sont très voisins de 700 mètres. Pour celles qui tombent un peu en dessous (48, 49, 50, 51, 66, 67, 73), il y a trace de travaux d'amenée qui les font dériver de quelques mètres plus haut. Il y a donc là ce que Belgrand appelait un *cordon de sources ;*

2° Toutes les eaux qui paraissent sortir de cette règle du niveau commun ont une température qui est aussi en discordance avec la loi des températures moyennes. Presque toutes les sources du dernier tableau sont dans ce cas. On est donc averti du déplacement de l'orifice par deux discordances univoques : la source est trop bas et a trop chaud. Il en reste que la température monte quand l'altitude de la source diminue, et par ce côté, nous donnons la main à une loi naturelle. Mais il ne faudrait pas voir ici l'effet de cette loi, ni attribuer les 2° de température constatés en plus dans le n° 68 que dans les nos 70 et 71, à ce qu'il y a 40 mètres de différence d'altitude. Il est trop clair que la décroissance ne se fait pas avec une pareille vitesse. Nous rencontrons encore ici la personnalité des sources ;

3° Comme pour les eaux des environs immédiats d'Olmet, la variation des résidus est beaucoup plus grande que celle de

la chaux et du sel marin. J'ai constaté à plusieurs reprises que le résidu était formé à peu près exclusivement de silice. J'avais cru pouvoir attribuer ses variations à la présence de quantités variables de matières organiques. Il n'y en a jamais que très peu quand il y en a; c'est la silice qui comble tous les vides; quelquefois, il y en avait assez pour *louchir* l'eau d'une façon perceptible à l'œil (65, 73). D'ordinaire l'émulsion de la partie non combinée de cette silice était assez fine pour que la transparence ne laissât rien à désirer ;

4° D'un bout à l'autre de la vallée, sur une longueur de 10 kilomètres, la seule sur laquelle aient porté ces études, ces sources sont celles du niveau de séparation du calcaire et des couches volcaniques. Les cartes géologiques ne montrent pas partout les calcaires. Dans celle de M. Boule, on ne voit guère que l'îlot que j'ai signalé à Olmet, et les couches d'Esmons, en relation avec l'étalement que le terrain subit aux environs d'Aurillac. Mais on le retrouve quand on cherche, tout le long du niveau des sources. Le grand éboulement qui a déplacé les eaux de Comblat s'est fait sur un fond régulier de marne. La propriété de Clavières glisse, elle aussi, sur des marnes en nappes; le village de Marfons est en voie de démolition permanente, assis qu'il est sur des couches qui, un peu plus haut, soutiennent, comme à Clavières, de larges pièces d'eau. Partout, en résumé, on est averti de la présence du calcaire aquitanien au niveau des sources. Il est presque partout caché sous les éboulis, mais il est là, et il commande l'agriculture ;

5° Bien qu'elles aient été retenues par ce terrain et aient par conséquent coulé plus ou moins longtemps sur ces roches calcaires, les eaux de ces sources ne contiennent pas beaucoup de chaux. Elles ne dépassent guère 20 milligrammes par litre. Ce n'est qu'en arrivant à Esmons (73), à la fin de la série, que la richesse en chaux augmente. Mais cette question en introduit une autre : comment se fait l'enrichissement d'une eau? Celles-ci viennent sourdre à un niveau assez constant de 700 mètres. Il y en a beaucoup plus haut : il y en a plus bas. En quoi diffèrent-elles les unes des autres? Cela est important à savoir, car si, par hasard, toutes ces sources se ressemblaient autant que celles du niveau de 700 mètres, les conclusions à tirer de ce que nous venons d'apprendre seraient tout autres.

VI

EAUX DU MASSIF

Le massif montagneux d'où sortent les eaux est un des rayons de la roue dont nous parlions en débutant, un secteur compris entre la vallée de la Cère et la vallée du Goul qui, très rapprochées au départ, s'écartent ensuite en se dirigeant l'une vers le S.-O., et l'autre vers le S.-S.-O. Il y a, dans ce massif, de l'eau et par suite des prairies à tous les étages, plus abondantes peut-être qu'ailleurs, à raison de l'exposition générale au S.-O. et de l'obstacle placé en travers des vents pluvieux. Si pour étudier la localisation des sources, nous commençons par la portion de la vallée de la Cère que nous connaissons le mieux, nous n'avons qu'à nous reporter au tableau que j'ai tracé du contrefort qui, d'Aurillac à Thiézac, domine la voie ferrée (V. p. 525).

Le socle calcaire [1] qui, dans ma pensée, s'étend sous tout le massif, et qu'on retrouve dans la vallée du Goul à Cros de Ronesque, Raulhac et Jou-sous-Monjou, à peine soulevée et en contact avec les micaschites, est de l'autre côté, au niveau d'Olmet, de 100 mètres au-dessus de la voie, et se retrouve à son niveau, ou à peu près, au Pas de la Cère ou à Trémoulet. Ce socle est par excellence la région des prairies arrosées, par la rivière dans le fond, par les sources sur les pentes. Au-dessus de cette région, et des terrasses à faible pente qu'elle porte, en commence une autre plus confuse, formée des produits éruptifs superposés ou juxtaposés des convulsions de la vie volcanique. C'est ici que se placerait, si elle était faite, l'histoire du volcan. Les matières qui remplissaient ce qui est aujourd'hui les vallées étaient les mêmes que celles que l'on trouve aujourd'hui dans les massifs; comme dans une statue, les vides étaient formés des mêmes matières que les pleins.

Le volcan n'était pas sculpté. Il faut se le représenter en gros comme le moule en creux du volcan actuel, les points les plus élevés de l'un correspondant aux plus bas de l'autre, des montagnes à la place des vallées, des vallées à la place de nos montagnes.

Autant qu'on peut juger de cette ancienne structure par ce qu'il en existe encore, ces alternatives de bombements ou de

1. Le Cantal miocène, par M. Boule. *Bulletin de la carte géologique*, t. VIII, 1896-1897.

vallées ont pu être nombreuses et se succéder sur un même point. Les coulées des matières liquides ou semi-liquides, de même que les matériaux entraînés par les eaux météoriques, allaient toujours combler les fonds. Ce qui est voisin aujourd'hui ne l'a donc pas toujours été. Les arbres et les débris végétaux qu'on trouve calcinés ou noircis n'ont pas sûrement poussé où on les trouve. Cela ne rend pas le procès facile à débrouiller. Nous sommes, naturellement, poussés à donner de l'importance à la dernière convulsion, celle après laquelle le volcan étant mort, c'est-à-dire n'augmentant plus d'épaisseur, ses flancs ont été livrés, sans compensation, aux agents destructeurs de la nature. Je ne dis même pas que le moment ait été le même sur les diverses faces du volcan.

Dans la vallée de la Cère, cette dernière convulsion a été le rejet de cette immense couche de basalte des plateaux qui domine la vallée. Sur les tranches que nous avons aujourd'hui sous les yeux, il y en a quelquefois plus d'une. Ces couches ont coulé alors dans une vallée qui occupait une situation intermédiaire entre la vallée du Goul et celle de la Cère. Ainsi couverte d'une couche régulière et continue de matériaux très résistants, cette vallée s'est conservée au même niveau pendant que les contreforts qui la bordaient ont été emportés par les agents atmosphériques et, en particulier, par les glaciers dont on trouve la marque à toutes les hauteurs, dans les vallées qui les remplacent maintenant. Ces vallées se sont creusées d'abord dans le terrain volcanique, puis dans les terrains tertiaires, au fur et à mesure qu'elles les rencontraient, ou bien encore dans les terrains primitifs à peine plus résistants.

Nous en sommes là, car l'histoire n'est pas finie. Mais, comme pour les humains, ce n'est pas une raison pour se dispenser de pousser aussi loin que possible cette histoire du passé.

Nous pouvons heureusement ici abandonner la question géologique pour revenir à nos eaux, et étudier l'influence du relief actuel pour déterminer la distribution des pluies et des sources. Nous trouvons, à la partie supérieure, ce qui reste de cette nappe de basalte qui avait autrefois couvert le fond d'une vallée, et qui limite une première nappe d'eaux, qui sont les *eaux de surface*.

A partir de cette ligne de faîte, et sur une épaisseur d'à peu près cent mètres sur une longueur d'environ 20 kilomètres, on voit une croupe en dos d'âne, qui est couverte de bois sur ses pentes, et éveille l'idée d'une coulée unique. Les eaux qui sont tombées sur ces pentes et qui n'ont pas été prises par le ruissellement et les ravins, augmentent le volume total des eaux qui descendent par imbibition, et contribue à l'alimentation de tous les biefs inférieurs. A la base de cette croupe, et lui servant de support, apparaît une première terrasse, où les eaux sont assez abondantes et où reparaît la prairie. Vient ensuite toute une succession de terrasses qui se superposent, en se débordant les unes les autres, jusqu'à celle qui repose sur le socle calcaire dont nous avons parlé. Les terrasses se succèdent les unes aux autres, grossièrement arrangées sur deux ou trois étages, qui restent parallèles et se suivent le long de la vallée, en traduisant sans doute, par cet aspect, les dimensions successives de puissance du cours d'eau qui la remplissait, et qui, fleuve puissant autrefois, a fini par être la petite rivière d'aujourd'hui. L'épaisseur moyenne de ce terrain, aux environs d'Olmet, depuis la première terrasse jusqu'au niveau du socle calcaire dont nous avons parlé, est d'environ 200 mètres. Les eaux y sont inégalement réparties en sources généralement médiocres au pied desquelles s'assoient des hameaux ; des céréales y reparaissent sur tous les points où il n'y a pas d'eau, ou bien la terre reste inculte lorsqu'elle est trop inabordable.

Nous donnerons à toutes ces eaux le nom commun *d'eaux de terrasses*, à la fois dans la vallée de la Cère comme dans tous les cas où nous les rencontrerons, et la question est pour nous d'indiquer leurs différences de composition à mesure qu'elles se rapprochent du niveau de 700 mètres.

Eaux de surface.

L'étude de ces eaux est intéressante parce que c'est au fond l'étude des conditions d'alimentation des vacheries à la montagne, c'est-à-dire dans les pâturages d'été. Quelle est la richesse en chaux, silice, et chlorure de sodium, des eaux dont elles s'abreuvent, et comment se forment ces sources ? Nous avons vu que les basaltes qui recouvrent toute la coulée ont massé dans d'anciens vallons. Le sol de ces vallons reçoit les eaux qui ont

traversé la couche fissurée qui les surmonte, et rien n'est moins surprenant que de trouver au bas actuel de la coulée toutes ces eaux se rassemblant soit dans des prés mouilleux, soit dans des régions tourbeuses, ou bien formant de véritables sources.

La mise en valeur de ces régions s'est faite en juxtaposant autant que possible une source et un buron, c'est-à-dire la maison où loge le vacher et où se font les fromages. Quand la source était toute faite, on faisait un abreuvoir. Là où elle devait venir de loin, on faisait une saignée et un drainage.

J'ai trouvé, au voisinage d'Olmet, une représentation quasi schématique des conditions diverses dans lesquelles se trouve généralement résolu le problème de l'eau sur le Cantal. Une vacherie, située sur la carte à une hauteur de 1,042 mètres, sous le nom de vacherie de Capelle, s'alimente avec une eau de source, qu'elle a amenée au buron d'une distance de 250 à 300 mètres. Elle arrive ainsi au sommet d'une croupe d'où elle est conduite sur les pentes. Une autre vacherie, à la distance de 600 mètres environ, a rencontré dans le vallon qui la sépare de la première une source volumineuse, beaucoup trop volumineuse pour qu'on puisse l'attribuer au récolement des eaux qui sont tombées sur le haut du vallon, qui n'a pas un kilomètre carré (voir p. 531). Il faut lui attribuer une origine plus lointaine, et considérer cette source comme une source de fin de coulée. Enfin, à environ 1 kilomètre de distance de ces deux sources, l'une ayant un court trajet superficiel, l'autre jaillissant à environ 50 mètres de son très ancien orifice, on trouve l'abouchement d'une ancienne saignée, amenant surtout, autant qu'on peut le voir, des eaux franchement superficielles, abondantes après les pluies, se réduisant à un mince filet pendant la saison sèche, mais suffisantes pourtant pour abreuver une grande vacherie quand elles se trouvent sur son parcours. Celle-ci n'a pas là de buron. Il est juxtaposé à une autre source.

A ces différences dans l'origine des eaux correspondent des variations dans la température, qu'il m'a paru intéressant de relever, pour les comparer à ce que nous avons vu avec les sources profondes. Voici quelques chiffres pour les trois espèces d'eau.

	Eau de Capelle.	Source du basalte.	Drainage —
19.IX.94	9,6	7.6	11.2
28.IX.94	9.6	7.7	—
2.IV.95	5,9	6.9	8,1
24.IX.95	10.2	7.4	11.0
2.IV.96	6,8	7.2	5.4
3.IX.96	9.4	7.6	11.2
15.X.96	9,1	7.4	10.6
28.IX.97	9.3	7.2	14.8
15.IV.98	6.8	7,7	6,0
15.VIII.03	8.7	7.6	11,0

Nous n'avons ici que des températures de printemps, d'été ou d'automne. On voit tout de suite cependant combien la température dans la source qui a coulé sous le basalte est plus constante que dans les autres. Elle est sûrement plus rapprochée de la température moyenne de la région. Celle de l'eau de Capelle est plus quelconque, et en rapport avec la nature des eaux, moitié parcours souterrain, moitié parcours près de la surface. Enfin, l'eau de la dernière source est tout simplement un drainage, avec ses irrégularités de débit et ses variations de température. En résumé, l'emploi du thermomètre permet de suite le classement de ces sources, et il faut en conclure que dans un pays qu'on connaît un peu, la température d'une source renseigne sur son histoire.

Voyons maintenant comment ces différents parcours influent sur la composition. Dans le tableau suivant, j'ai réuni ces trois types d'eau à d'autres eaux de surface, provenant de drainages.

Nos d'ordre.	Origine. —	Alt. —	Dates. —	Tempre. —	Résidu. —	Chaux. —	Sel marin.
74	Capelle (buron)	1042	19.IX.94	9.6	30	4	2.0
75	—	—	24.IX.94	10.0	34	3	2,0
76	—	—	2.IV.96	6.8	29	3	2,0
77	—	—	3.IX.96	9,4	36	4	—
78	—	—	9.IX.99	10.2	30	6	2,0
79	—	—	16.VIII.03	8,7	29	—	2,0
80	Capelle (basalte)	1022	19.IX.94	7.7	35	3	2,0
81	—	—	24.IX.95	7,4	35	3	3,0
82	—	—	2.IV.96	5.5	29	3	3,0
83	—	—	3.IX.96	7,6	34	5	—
84	—	—	9.IX.99	7,8	26	4	3,0

85	Capelle (drainage)	1030	2.IV.96	5,4	29	3	2,0
86	—	—	3.IX.96	11,2	30	5	—
87	Capelle (t. mouilleux)	1050	12.IV.96	7,5	42	6	2,0
88	St Clément (drainage)	1021	28.IX.95	12,0	50	10	2,5
89	Curebourse (drainage)	1000	15.IX.01	14,0	69	11	3,5
	—	—	15.VIII.03	10,4	66	12	3,5
91	Les Huttes (source)	—	6.VIII.97	14,7	44	5	2,5
92	Les Huttes (rigole)	1000	15.IX.01	11,8	122	12	3,0

Pour toutes les eaux, qui sont en écoulement au voisinage de la surface, on voit combien le résidu est faible, et surtout la teneur en chaux. Dans ce terrain exclusivement basaltique, les silicates solubles sont rares et la chaux manque presque absolument. La dernière eau (92) est une eau d'irrigation dans laquelle la silice est en suspension et se coagule de suite à la surface, quand on évapore.

Voilà la composition d'une eau au départ, au moment où elle débute. Il est curieux qu'elle contient déjà ce qu'elle contiendra jamais de sel marin, à moins de circonstances exceptionnelles. Ceci nous confirme dans la pensée que le sel n'est pas emprunté au terrain ou qu'il ne lui est pris que pour une faible partie, et qu'il provient de celui que les hommes et les animaux disséminent constamment autour d'eux, ou au sel atmosphérique, à celui qui sale les pluies. Passé une certaine épaisseur, il n'y en a pas dans le sol, à moins de circonstances dont nous trouverons un exemple.

Eaux des terrasses.

J'ai étudié de la même façon les eaux de terrasses comprises entre les basaltes et le niveau de 700 mètres. La plus nette de ces terrasses est celle qui porte l'énorme coulée qui flanque la vallée d'un bout à l'autre. C'est à elle qu'appartiennent les eaux de Vixouge. Il y a un grand nombre de sources pareilles, formant une frange continue aux pieds des bois, qui en ce point-là couronnent la vallée. Plus loin, en remontant la vallée, cette première terrasse est moins visible, à cause de l'allure tourmentée du sol. Les diverses eaux qu'on trouvera dans ce tableau sont prises un peu au hasard, en tenant compte seulement de leur altitude. Ce sont partout des sources. On a négligé les eaux

d'irrigation, qui se font surtout à l'aide de l'eau des ravins. Comme, dans le haut de la vallée, la couche de 700 mètres n'existe plus, noyée qu'elle est en apparence sous une inondation de lave, ce n'est qu'à partir de Vic que nous la retrouverons.

Nos d'ordre.	Origine.	Alt.	Dates.	Tempre.	Résidu.	Chaux.	Sel marin.
93	Vixouge (abreuvoir)	820	30.IX.96	11,6	83	7	8.5
94	—	—	14.IX.97	11.4	73	12	4.0
95	—	—	18.X.98	9,9	100	17	3,0
96	Vixouge (château)	825	18.X.98	11,0	95	15	5.0
97	—	—	1.VIII.03	12,2	93	12	4.5
98	Salvagnac (gorge)	730	16.IX.96	8,0	70	6	2,0
99	La Goutte	807	6.X.96	8,0	76	6	3.0
100	Les Griffaudes	910	6.X.96	8,8	45	6	2,0

Sauf que les eaux de Vixouge se sont enrichies d'une manière anormale en chaux et en sel marin, comme presque toutes celles qui portent un village au voisinage des sources, on voit que tout se passe ici comme au niveau supérieur. La chaux n'est pas devenue plus abondante à travers un sol qui n'en contient pas d'une façon sensible, et il n'est pas étonnant que toutes ces eaux viennent se relier par des transitions avec celles du niveau de 700 mètres, qui en diffèrent surtout en ce qu'elles sont plus abondantes, ayant rencontré une couche marneuse qui les empêche de descendre plus bas.

Eaux au-dessous de la couche de 700 *mètres.*

Ce qui est intéressant, c'est de chercher comment ces eaux traversent les couches calcaires qu'elles rencontrent à ce niveau. Je parle non de celles qui les traversent à proprement parler, car elles sont très épaisses, mais de celles qui se trouvent rejetées par côté et y réapparaissent comme sources à un niveau plus ou moins inférieur. Cherchons quelle est la composition des eaux au-dessous de 700 mètres.

Ici nous sommes forcés de mettre un peu d'indécision dans nos termes. Cette couche calcaire n'a pas un niveau très régulier; comme elle forme terrasse sur une pente et terrasse supportant une forte poussée, elle a subi des éboulements tels que l'éboulement formidable qui a fait descendre de 70 mètres les

sources de Comblat-le-Pont, ou encore ceux de Clavières et Marfons. Il faut donc donner de l'élasticité à l'expression niveau de 700 mètres. Comme, d'un autre côté, ce niveau s'enfonce sous le sol à la hauteur du Pas de la Cère, et n'est pas à 75 mètres du niveau de la rivière, en face de Maruéjouls, où il commence à être au-dessus du sol, la surface sur laquelle doivent s'étendre nos investigations n'est pas grande. Enfin, la région à étudier est couverte d'éboulis au milieu desquels la recherche de l'origine de l'eau est souvent fort difficile.

Je n'ai trouvé dans cet espace qu'une seule véritable source, caractérisée par la constance de température et la régularité de son débit, c'est celle de Comblat. Les autres font des réapparitions après irrigation de sources plus élevées. Il y en a qui sont restées en terrain volcanique, les autres ont pénétré les calcaires. Les localités sont prises en descendant la vallée. A la suite, je place naturellement les analyses de l'eau de Cère qui nous donneront la synthèse de tous les phénomènes longuement analysés pour cette petite région du Cantal.

Nos d'ordre.	Origine.	Alt.	Date.	Tempre.	Résidu.	Chaux.	Sel marin.
101	Salvagnac (village)	654	24.IX.95	8.7	80	10	3,0
102	—	—	16.IX.96	8,9	76	86	2,0
103	Vic (route de la gare)	660	3.IX.03	14,0	108	—	9,0
104	Comblat (petites.)	654	2.X.96	10,2	133	25	4,0
105	—	—	10.IX.99	10.2	160	44	3.0
106	—	—	1.VIII.03	10,4	141	24	4,0
107	Olmet (réapp.)	680	25.IX.95	14,0	88	16	2,0
108	Lalo	630	3.X.99	13,1	189	53	3,0
109	—	—	20.IX.01	12,2	175	61	3,0
110	Canteloup	630	10.VIII.96	12,4	300	119	—
111	—	—	20.IX.01	12,8	276	108	3,5
112	Arpajon (S. Appert)	628	3.X.99	10.4	357	126	10,0
113	Arpajon (fontaine)	—	13.IX.00	18.0	54	6	5,0

On voit qu'à mesure qu'on pénètre sur le pays calcaire, la chaux atteint des proportions que nons ne connaissions pas jusqu'ici.

La première source d'Arpajon est une cressonnière ; la seconde est l'eau de la commune qu'on m'a donnée comme pro-

venant d'une colline calcaire. Il est visible qu'elle est puisée plus haut qu'on ne croit, et est une fontaine des régions volcaniques. En somme, toute eau dont la teneur en chaux dépasse 20 ou 25 mgr. par litre n'a pas léché la couche calcaire sur tout le long parcours que nous avons étudié.

Voici maintenant des analyses de la Cère prise au même point :

Nos d'ordre.	Origine.	Alt.	Dates.	Tempre.	Résidu.	Chaux.	Sel marin.
114	Cère, Comblat	630	13.IV.95	—	34	6	2,5
115	—	—	9.IX.95	19,8	74	8	2,0
116	—	—	5.IV.96	9,4	47	7	3,5
117	—	—	2.IX.96	8,5	58	5	3,0
118	—	—	1.VIII.03	12,0	58	6	3,5

On voit qu'en résumé on peut dire, comme synthèse générale de tout ce qui précède, que la rivière emporte très peu de chaux de la traversée, par le dehors et par les profondeurs, de la partie volcanique du département.

VII

EAUX DES AUTRES MASSIFS

Nous avons maintenant à faire de la même façon l'étude des autres massifs montagneux rayonnant autour du cratère central dans la masse volcanique du Cantal. Comme nous allons voir qu'ils sont presque tous bâtis sur le même plan que celui que nous venons d'apprendre à connaître, nous pourrons abréger beaucoup, et nous borner pour ainsi dire à faire passer sous les yeux du lecteur les pièces du procès, sans insister sur les conclusions qui en sortent.

Nous divisons nos eaux en eaux supérieures au niveau de 700 mètres, classées suivant leurs altitudes décroissantes ; en eaux du niveau de 700 mètres partout où nous pourrons le rencontrer; en eaux inférieures, que nous suivons, le cas échéant en pays calcaire et pays gneissique. Je commence naturellement par celui que j'ai le mieux étudié.

Massif Cère-Jordanne.

Ce massif comprend la rive droite de la Cère et la rive gauche de la Jordanne J'énumère d'abord les localités de la vallée de Cère où j'ai fait des prises d'eau.

a. VALLÉE DE LA CÈRE : AU-DESSUS DE 700 MÈTRES

Nos d'ordre.	Origine.	Alt.	Dates.	Tempre.	Résidu.	Chaux.	Sel
119	Combelles	1050	7.X.96	11,4	34	3	2,0
120	Les Blattes	1000	7.X.96	11,6	41	2	3,5
121	Entremonts	950	7.X.96	11,5	32	3	2,5
122	La Pause	950	8.X.96	10,8	48	3	2,0
123	La Rive	930	11.IX.96	15,0	47	5	2,5
124	Salilhes	880	8.X.96	10,6	100	10	14,0
125	Onsat	877	10.X.96	12,2	57	—	4,0
126	Muret	850	8.X.96	12,7	38	4	2,0
127	Thiézac (font.)	807	19.IX.95	13,8	70	7	2,0
128	—	—	31.VIII.96	11,5	62	5	2,0
129	Thiézac (gare)	800	31.VIII.96	7,0	45	12	3,5
130	Malbert (route)	807	25.VIII.03	9,0	84	5	3,0
131	Cabanusse	730	11.IX.95	8,0	52	5	2,0
132	—	—	17.IX.96	7,8	52	8	2.0
133	Meymac	735	18.IX.95	9,8	75	7	3,5

b. VALLÉE DE LA CÈRE : AU-DESSOUS DE 700 MÈTRES

Nos d'ordre.	Origine.	Alt.	Dates.	Tempre.	Résidu.	Chaux.	Sel
134	Vic (ch. d'eau)	700	1.IX.03	12,2	84	15	2,0
135	—	—	1.IX.03	16,2	45	3	1,5
136	Vic (fontaines)	680	19.IX.95	12,0	89	19	1,5
137	—	—	31.VIII.96	11,8	72	13	2,0
138	Combiat (ferme)	670	21.IX.95	11,7	105	13	3,0
139	Cabanes	660	21.IX.95	11,6	136	33	5,0
140	—	—	17.IX.96	11,6	159	28	3,0
141	Polminhac	650	21.IX,95	11,6	126	23	3,0
142	—	—	17.IX.96	11,4	136	16	4,0

Observations. — 119 à 122. Sources des propriétés. —123, 125, 129. Drainages. —124. Source du village, passant sous une écurie à quelques mètres. — 127. Fontaine du village. — 131 et 132. La plus constante de Cabanusse, bâtie sur des éboulis — 134. Source — 135. Eau de l'Iraliot.

Il est curieux de voir la netteté avec laquelle le niveau de 700 mètres apparaît dans le tableau. Toutes les eaux récoltées au-dessus ont une teneur en chaux inférieure à 10^{mgr} par litre. Seule celle de Salilhes fait exception, mais la source est au

milieu du village, et passe sous une étable où elle récolte aussi ses 14 milligrammes de sel marin. Aux sources captées par la ville de Vic, on est en plein niveau de 700 mètres et la chaux reparaît. Le château d'eau a ses souterrains dans le calcaire. A partir ce moment, toutes les eaux sont plus riches en chaux.

b. VALLÉE DE LA JORDANNE : AU-DESSUS DE 700 MÈTRES.

Je me suis borné, pour le haut de cette vallée, à l'étude du fond et des sources qui s'y réunissent : je ne ferai donc pas la séparation des deux versants. Ici, comme dans la vallée de Cère, c'est le versant exposé au nord qui est le plus arrosé.

Nos d'ordre.	Origine. —	Alt. —	Dates, —	Tempre. —	Résidu. —	Chaux. —	Sel marin.
143	Le Mas Soubro	917	25.VIII.96	8.7	56	3	4
143	—	—	2.IX.98	—	66	11	4
145	Mandailles	900	25.VIII.96	9.8	55	5	2
146	—	—	2.IX.98	9.7	53	8	2
147	St-Cirgues	780	25.VIII.96	10,0	38	2	2
148	—	—	2.IX.98	11,6	86	11	10
149	Lascelle	760	25.VIII.96	12.5	38	2	2
150	—	—	2 IX.98	—	39	7	2
151	Mousset	700	25.VIII.96	9,4	60	4	3
152	—	—	2.IX.98	9,4	90	7	3

Observations. — 143, 144, 148. Voisine d'habitations. — 145, 146, 147, 151, 152. Fontaine des villages. — 149, 150. Eaux d'irrigation.

A Mousset, je rencontre un groupe de sources, apparaissant toutes au voisinage du niveau 700, que la ville d'Aurillac surveille depuis longtemps pour son alimentation. Tant que la question a été en suspens, je n'ai pas voulu entrer dans le débat par des analyses. Je n'y interviendrai pas encore aujourd'hui. J'aurais pourtant été très heureux de montrer quelle est, dans cette vallée, la fécondité de ce niveau qui ramène à la surface des eaux tombées sur l'énorme contrefort du plateau du Coyan. Il me suffit pour le moment de dire qu'elles occupent toutes le fond de la vallée, sur une longueur d'un peu plus de 7 kilomètres, de Velzic à Saint-Simon, et peuvent débiter à elles toutes de 30 à 40 mètres cubes par seconde. Voici leurs altitudes d'après les documents publiés [1].

Source du 9e kil.	693	Saphary	708
Mousset	701	Lours et Chandelon	708
Fracort	701	La Force	708
Vergne noire	702	Granier	700
Emprades	701-710	Lassale	690
Daubet	610	Daubet	695

1. Ville d'Aurillac : question des eaux. Aurillac, 1903.

b. VALLÉE DE LA JORDANNE : AU-DESSOUS DE 700 MÈTRES.

Ici, comme dans la vallée de la Cère, les eaux reparues par les sources sont immédiatement prises par l'irrigation et alimentent de belles propriétés placées à flanc de coteau. Voici l'analyse de quelques-unes de ces eaux :

Nos d'ordre.	Origine.	Alt.	Dates.	Tempre.	Résidu.	Chaux.	Sel marin
	—	—	—	—	—	—	—
153	Maurou	655	17.IV.95	8,2	131	43	3.0
154	—	—	10.IX.96	12.2	160	41	3,0
155	Fabrègues	655	26.VIII.96	12.0	149	52	4.0
156	Noalhac	660	26.VIII.96	12.8	100	31	2.0
157	Cantuel	653	26.VIII.96	9,3	223	88	3,0
158	Le Buis	635	25.VIII.96	10.4	333	136	11
159	Aurillac (Pt rouge)	622	17.IV.97	8,4	293	134	4.0
160	—	—	6.VIII.97	—	312	122	6.0
161	—	—	22.VIII.98	16.4	312	98	3.0
162	Tourde (enclos)	—	22.VIII.98	—	312	175	2.0
163	Las Canaux	610	27.VIII.97	13.6	357	163	3,0
164	—	—	—	16.4	339	135	3,0

Observations. — 153, 154. Sources de la ville d'Aurillac. — 155. Source derrière la ferme. — 156. Source amenée de 400 mètres devant le château. — 157. Fontaine au-dessous de la ferme. — 158. Source en aval d'un jardin. — 159 à 162. Sources au bas d'un coteau inhabité. — 163, 164. Très ancienne Source en pays calcaire.

Le passage à l'eau calcaire, une fois le niveau de 700 mètres dépassé, se fait comme dans la vallée de Cère. Tout nous conduit à penser que ces nappes calcaires sont continues au-dessous des couches volcaniques, entre la Cère et la Jordanne, et y créent un niveau d'eaux, qui sortent par où elles peuvent, quand ce niveau revient au jour. Voyons maintenant si nous pourrions trouver cette même structure en allant plus loin, dans la vallée secondaire de la rivière d'Authre.

VALLÉE DE L'AUTHRE

Ici mes investigations ont été moins nombreuses. Mais nous allons pourtant retrouver ce niveau de 700 mètres. Il est surtout bien évident à Marmanhac, célèbre par l'abondance de ses eaux autour de ses deux châteaux de la Voulte et de Sédages, où il y a au moins une douzaine de sources très abondantes, placées au même niveau.

Voici les sources que j'ai étudiées, dans l'ordre de leur altitude :

Nos d'ordre.	Origine.	Alt.	Dates.	Tempre.	Résidu.	Chaux.	Sel marin.
	—	—	—	—	—	—	
165	Pradines (Delsol)	837	6.IX.96	13,5	48	4	—
166	— Faubladier)	825	6.IX.96	9,8	71	11	—
167	— (Puits)	—	12.IX.99	13,0	83	10	8
168	Fau	730	25.VIII.95	16,5	181	67	5
169	Marmanhac	690	26.VIII.95	9,6	81	11	5
170	—	—	6.IX.96	9,7	98	14	—
171	—	—	12.IX.99	9,8	88	15	2
172	Marmanhac (vill.)	690	26.VIII.95	10,2	109	20	5
173	—	—	6.IX.96	9,7	115	18	—
174	—	—	12.IX.99	9,8	128	22	7
175	La Bessouille	690	26.VIII.95	10.4	130	31	6
176	Le Mercadier	635	12.IX.99	12,0	206	50	3
177	Jussac.	630	12.IX.99	14,6	269	74	1,5

Observations. — 167. Puits de service du jardin, pas loin de la fosse. — 168. Source voisine d'un pacage. — 169 à 171. Source de Fontrilles ou du Bout-du-Lieu. — 172 à 174. Source en contre-bas de la route.

Nous retrouvons ici l'image exacte des deux vallées précédentes. Le soubassement calcaire persiste donc entre la vallée de la Jordanne et celle de l'Authre.

VALLÉES DE LA DOIRE, DE LA BERTRANDE, DE L'ASPRE ET DE LA MARONNE

La recherche est rendue ici plus difficile par les allures tourmentées du sol, et l'entrée en scène de terrains nouveaux. Du côté du volcan, le niveau de 700 mètres est englouti par les coulées. De l'autre il vient buter contre un sol qui n'est plus volcanique. La zone sur laquelle on peut le rencontrer est donc très étroite. Cette zone mériterait certainement d'être mieux étudiée que je n'ai pu le faire. Je me suis contenté de tourner autour du plateau, en faisant des prises d'eau dont je comparais la composition avec l'altitude, en cherchant si la relation était celle que je connaissais déjà. Voici quelques chiffres qui le montrent :

Nos d'ordre.	Origine.	Alt.	Dates	Tempre.	Résidu.	Chaux.	Sel marin
	—	—	—	—	—	—	
178	Pentes du puy Mary	1350	27.VIII.97	6,8	40	4	2
179	Col. de Néronne	1300	28.VIII.96	8,4	34	4	2
180	—	—	27.VIII.97	7,6	34	7	2

181	Salers	920	28.VIII.96	11,3	45	7	3
182	—	—	29.VIII.97	11,6	49	16	3
183	St-Cernin (Chemy)	825	28.VIII.96	8,4	64	8	2
184	St-Martin	676	28.VIII.96	14,3	75	8	2
185	—	—	29.VIII.97	15,0	101	21	2
186	Fontanges	674	30.VIII.97	9,6	82	18	3
187	La Pierre (ferme)	672	30.VIII.97	10,6	57	10	1
188	La Pierre (chat.)	672	30.VIII.97	11,4	62	12	3
189	Palémont (ch.)	672	30.VIII.97	11,7	69	12	4

Le niveau de 700 mètres a été dépassé deux fois : une première, à Saint-Martin-Valmeroux ; une seconde fois à Fontanges, où les eaux sont abondantes comme à Marmanhac, et où nous retrouvons la série des beaux châteaux qui s'asseyent au bord des sources.

Malheureusement, la recherche devient de plus en plus difficile si on continue à tourner autour du centre, parce que, dans toute la moitié nord du Cantal, le pays reste *haut* pour se fondre avec le massif montagneux du Mont-Dore, qui est volcanique aussi : le niveau de 700 mètres est enfoui sous le sol. Sur tout le quadrant compris entre les vallées du Mars, orientée nord-ouest, et celle de l'Alagnon orientée vers le nord-est, j'ai dû me borner à une exploration très rapide, dont voici les résultats. J'ai séparé le bassin de la Dordogne et celui de l'Allier. Ce sont à peu près les arrondissements de Mauriac et de Murat.

BASSIN DE LA DORDOGNE

Nos d'ordre.	Origine.	Alt.	Dates.	Tempre.	Résidu.	Chaux.	Sel marin.
190	Source des Fées	1197	4.IX.00	5.0	80	3	1,5
191	Montée du Pavin	1102	4.IX.00	—	174	9	3,5
192	Prentegarde	1150	31.VIII.97	9,8	60	9	2,0
193	Ségur	1033	31.VIII.97	12,0	70	13	1,5
194	Lavigerie	1060	29.VIII.97	12,0	55	13	3,0
195	Dienne	1058	28.VIII.96	11,2	72	8,0	4,0
196	—	—	29.VIII.96	11,4	79	17	—
197	Église-Neuve	1000	4.IX.I.97	7,0	42	5	1,5
198	Sarron	970	4.IX.00	16,4	27	4	2,0
199	Trizac	930	2.IX.98	—	87	14	8.0
200	Riom-es-Mont.	845	2.IX.98	—	74	12	3,0

201	Coindre	800	2.IX.98	11	70	13	4,0
202	—	—	2.IX.98	11,6	39	9	5.0
203	Moussages	800	2.IX.98	11,6	68	11	3.0
204	St Amandin	780	2.IX.98	—	39	8	3.5
205	Roche des f. Monnay.	710	2.IX.98	20	42	10	3,5
206	Mauriac	698	2.IX.98	12.4	98	11	6
207	Condat	691	2 IX.98	12,0	49	11	3.0
208	—	—	4.IX.00	15.0	47	7	3,5

Observations. — 190. Source qui alimente le lac Pavin. — 191. Source ferrugineuse en montant au lac. — 192-200. Fontaines des localités. — 201 et 202. Deux sources, avant et après le village. — 203, 204. Fontaines. — 205. Sur la route de Bort à Condat. — 206. Fontaine de la petite place. — 207, 208. Fontaines avec longue canalisation, venant du versant en face.

Nous n'avons pas rencontré le niveau de 700 mètres, mais nous en avons approché à Mauriac, où l'eau présente les caractères que nous avons déjà eu à relever plusieurs fois, toujours avec les eaux qui ont léché les couches argileuses et ont un léger louche d'argile. On retrouve d'ailleurs les couches miocènes à Salins, à Drugeac (M. Boule), à des hauteurs très voisines de 700 mètres. Nous n'avons donc pas perdu de vue le fanion; seulement il s'enfonce sous terre, et ne reparaît que lorsque le sol s'abaisse à son niveau.

A l'autre extrémité du plateau, à Condat, nous retrouvons bien le niveau hypsométrique de 700 mètres, mais nous ne sommes plus dans les mêmes conditions. Il n'y a plus de plateau calcaire. On voit apparaître à sa place une puissante épaule de terrain primitif, qui formait évidemment la rive de la mer ou des grands étangs miocènes et oligocènes, relevée qu'elle était déjà à son niveau actuel à des hauteurs de 1,000 et 1,100 mètres. Elle apparaît partout dans la plaine, en partie recouverte par des coulées provenant du Cantal, du Puy-de-Dôme, en partie nue et remaniée par les accidents de surface. Ces gneiss ne sont pas très différents, au point de vue de leur résistance aux remaniements, de ce que sont les couches volcaniques, dont ils épousent souvent les courbes. Ils le sont en général plus que les couches calcaires. On comprend donc que le volcan ait été moins arrasé et l'ait été plus régulièrement que du côté ouest. Nous allons retrouver cette épaule dans l'arrondissement de Murat et la vallée de l'Alagnon.

BASSIN DE L'ARAGON

Les localités sont ici rangées dans l'ordre des altitudes à partir du fond de la vallée, à la station du Lioran.

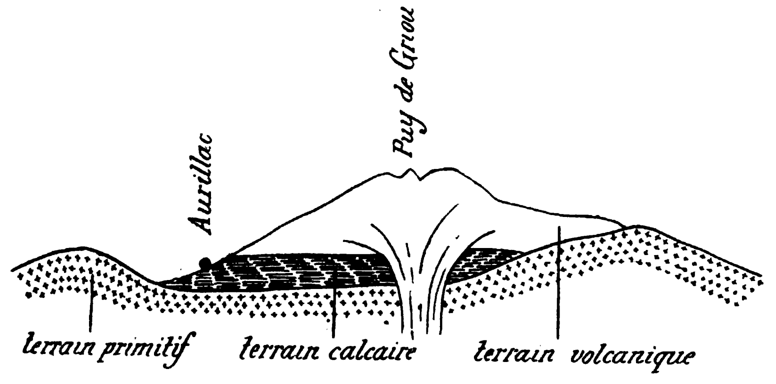
Nos d'ordre.	Origine —	Alt. —	Dates. —	Tempre. —	Résidu. —	Chaux. —	Sel marin.
209	Source de l'hôtel	1152	25.VIII.03	8,7	43	3	1,5
210	Gare	1152	3.IX.95	15,5	36	4	—
211	Chef de district	1152	6.IX.99	13,0	36	4	2,0
212	Chalinargues	1077	3.IX.95	10,0	134	13	15,0
213	—	1075	3.IX.95	9,0	143	10	18,0
214	Rancilhac	1070	3.IX.95	9,8	124	19	12,0
215	Mouret	1047	3.IX.95	10,2	81	8	3,0
216	Farges	1042	3.IX.95	9,6	138	15	9,0
217	La Bourgeade	980	31.X.97	7,0	38	5	1,5
218	Allanche	950	31.X.95	13,0	90	15	2,0
219	Murat (fontaines)	917	3.IX.95	13,0	97	10	3,5
220	—	—	28.VIII.96	11,8	90	9	3,5
221	Murat (gare)	—	3.IX.95	14,0	51	5	»
222	Ste-Anastasie	900	3.IX.95	12,0	135	19	»
223	Barr. de Marret	850	3.IX.95	14,0	143	35	»
224	Neussargues	800	3.IX.95	18,0	117	13	»

Observations. — 209 à 211. Sources autour de la station. — 212 et 213. Les deux sources du village, contaminées toutes deux. — 214. Source du ravin entre Rancilhac et Mouret. — 215. Source venant des bois de la Pinatelle. — 216. Source en face du lavoir. — 217 à 224. Source des localités.

Dans ce bassin où le terrain primitif et le terrain volcanique couvrent en quelque sorte en damier la carte géologique, leurs influences sur les eaux se superposent, et ne sont pas faciles à débrouiller. Nous les retrouverons plus nettes dans les secteurs qui nous restent à parcourir. Comme nous visons, pour le moment, à isoler l'action du terrain volcanique, nous pouvons nous arrêter un instant pour collationner les notions déjà réunies à son sujet, et en faire une sorte de synthèse provisoire.

Nous restons fidèles à l'ensemble des faits connus en nous représentant le Cantal conformément à la figure suivante, comme un immense gâteau volcanique sorti par un orifice d'éjection, placé au milieu du cirque de hauteurs, dont le puy de Griou occupe aujourd'hui le centre. L'emplacement du cratère

était occupé à ce moment par les dépôts, de fond ou de rivages, d'une mer tertiaire, qui en ce point, n'était pas très étendue du côté de l'Est, et y était bornée par un rivage de Gneiss et de Micaschistes, qui est celui contre lequel nous sommes venus nous buter tout à l'heure, et qu'on voit encore à nu, partout où il n'a pas été recouvert par les éruptions. J'ai, sur la figure, laissé entre l'orifice et le rivage une masse calcaire, pour tenir compte



Coupe schématique du Cantal, par Aurillac et le puy de Griou.

de ce qu'il y a, à Dienne, à Laveissière, et probablement ailleurs, des lambeaux calcaires rejetés du côté de l'Est, par les explosions. Mais cela n'a pas beaucoup d'importance. L'important est que le massif Est et le massif Ouest ne sont pas identiques. Dans le massif Est, le terrain volcanique perméable recouvre directement le terrain primitif, presque aussi perméable. Dans le massif Ouest, le terrain volcanique s'est édifié sur une couche imperméable qui forme plateau intérieur, et dirige suivant ses lignes de plus grande pente, vers ces bords extérieurs, et le long de ses vallées profondes, toutes les eaux que le volcan reçoit au-dessus de lui. Voilà ce que nous ont appris les grands coups de sonde donnés à l'aide de notre analyse d'eaux. Ce n'est pas le moment d'entrer dans le détail de toutes les conséquences de cette structure intérieure du volcan. Nous la retrouverons dans la suite de nos études.

Le Gérant : G. Masson.

Sceaux. — Imprimerie Charaire.

17me ANNÉE NOVEMBRE 1903 No 11

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

LA FIÈVRE JAUNE

Rapport de la mission française

Composée de MM. MARCHOUX, SALIMBENI ET SIMOND.

(Planche XV.)

La dernière épidémie de fièvre jaune au Sénégal, en avril 1900, a de nouveau attiré l'attention sur cette maladie dont l'apparition cause tant de trouble dans le commerce de cette colonie. Quelques mois plus tard, en février 1901, la Commission militaire américaine de la Havane faisait connaître que le virus de la fièvre amarile existe dans le sang des malades, et qu'il est transmis à l'homme sain par l'intermédiaire d'un moustique particulier. Il était de la plus haute importance de vérifier ces données nouvelles, car si elles étaient confirmées, la défense contre la fièvre jaune devait être orientée tout autrement qu'on ne l'avait fait jusqu'à présent.

Aussi, les pouvoirs publics, le service de santé des Colonies, les représentants du Sénégal et les négociants notables de cette colonie se trouvèrent-ils d'accord pour demander l'envoi à Rio-de-Janeiro d'une mission française pour l'étude de la fièvre jaune.

Cette mission fut instituée sur la proposition de M. Decrais, ministre des Colonies, par une loi du 12 juillet 1901[1]; elle était placée sous la direction scientifique de l'Institut Pasteur. Les Chambres votèrent les crédits nécessaires pour 1901 ; la mission fut ensuite entretenue grâce aux subventions du ministère des Colonies et des budgets coloniaux.

1. M. Bienvenu Martin, rapporteur à la Chambre des députés ; M. Charles Dupuy, rapporteur au Sénat.

A son arrivée à Rio-de-Janeiro (nov. 1901), la mission fut reçue avec le plus grand empressement par les pouvoirs publics du Brésil, qui mirent à sa disposition des locaux fort bien aménagés pour un laboratoire et lui donnèrent toutes les facilités pour ses travaux.

En présentant le mémoire qui résume les recherches de MM. Marchoux, Salimbeni et Simond, nous tenons à exprimer notre reconnaissance au gouvernement brésilien, aux directeurs de la Santé de Rio-de-Janeiro, au directeur et au personnel de l'hôpital São-Sebastião, et à tout le corps médical brésilien pour l'accueil cordial qu'ils ont fait à la mission française et l'aide efficace qu'ils lui ont donnée.

Dr Roux.

I

Connue depuis la découverte de l'Amérique, puisque l'équipage de la 2e caravelle de Christophe Colomb en fut atteint, la fièvre jaune a été l'objet d'observations nombreuses faites au cours d'épidémies, souvent très graves, survenues surtout sur les deux rives de l'océan Atlantique. Nous n'avons pas l'intention de passer en revue toute la littérature qui s'y rapporte et qu'on trouvera dans le traité de géographie médicale de Hirsch [1], dans le traité de Berenger-Feraud [2] et aussi dans l'excellente monographie de MM. Azevedo Sodre et Miguel Coutho [3].

Jusqu'en 1881, époque où Finlay [4] pour la première fois émit l'hypothèse que le moustique était l'agent de transport de la maladie, on n'avait sur l'étiologie de cette redoutable affection que des opinions vagues. On savait néanmoins déjà, par des faits bien observés, que la fièvre jaune se contractait la nuit et qu'on s'en préservait en s'éloignant le soir des foyers de contamination. Mais il faut arriver jusqu'au mémoire publié en 1901 [5]

1. Auguste Hirsch, *Handbuch der historisch-geographischen pathologie.* Stuttgart, 1881.

2. Berenger-Feraud, *Traité théorique et clinique de la fièvre jaune.* Paris, 1891.

3. Azeredo Sodre et Miguel Coutho, *Gelbfieber.* Collection Nothnagel, 1901.

4. Carlos Finlay, Série d'articles publiés dans *Cronica Medico-quirurgica de la Habana* et *Anales de la Academia de sciencias medicas de la Habana,* 1881-1884.

5. *The etiology of th yellow fever, a preliminary note.* Walther Reed, Carroll, Agramonte et Lazear, *Procedings of the twenty Eigth annual meeting held at Indianapolis,* 22-26 octobre 1900.

par la Commission américaine de Cuba, pour avoir des données étiologiques précises.

Nous ne reviendrons pas longuement sur les travaux maintenant si connus de MM. Reed, Carroll et Agramonte.

Nous savons qu'ils ont constaté que le virus circulait avec le sang. Ils ont vérifié que des moustiques (*St. fasciata*), infectés depuis au moins 12 jours, étaient capables de donner par leur piqûre la maladie à une personne sensible. Après avoir établi ce mode d'infection, ils ont démontré par des expériences de laboratoire, vérifiées ensuite dans une grande expérience portant sur toute la ville de la Havane[1], qu'il n'y en avait pas d'autres. Ils ont encore prouvé que le germe de la maladie, impossible à trouver par examen direct aussi bien dans le sang des malades que dans l'organisme des moustiques infectés, traverse la bougie Berkefeld quand on étend du sérum frais de malade de son volume d'eau distillée. Il résulte encore de leurs expériences que non seulement ce germe est très petit, mais encore qu'il est très fragile, puisqu'un chauffage de 10 minutes à 55° suffit à rendre inoffensif 1,5 c. c. de sang virulent.

Depuis ces expériences, d'autres confirmatives ont été faites par Juan Guitéras à la Havane[2], par Ribas et Lutz à São Paulo[3], et dernièrement par la commission américaine envoyée à la Vera-Cruz[4].

The etiology of yellow fever, an additional note, W. Reed, Carroll et Agramonte, *Journal american medical Association*, 16 février 1901. Note lue au Congrès de la Havane, 4-7 février 1901.

Experimental yellow fever, from the Transactions of the Association of american Physicians, t. XVI, 1901.

The etiology of yellow fever, a supplemental note, Reed et Carroll, lu au 3e Congrès annuel de the Society of American Bacteriologists, Chicago Ill. 31 décembre 1901, and January 1902.

The prevention of yellow fever, Reed et Carroll, *Medical Record* 26 octobre 1901.

1. Cette dernière expérience a été réalisée d'une manière remarquable par M. W. Crawford Gorgas, The work of the sanatory department of Havana, with special reference to the repression of yellow fever. *Medical Record*, septembre 1901. *Results obtained en Havana from the destruction of the* Stegomya fasciata *infected by yellow fever. The propagation of yellow fever. Sanitary department Havana, Cuba*, 16 février 1902. *Report of vital statistics of the city of Havana* (1900-1901), janvier 1902.

2. *Experimental yellow fever at the inoculation station of the sanitary dpeartment of Havana with a view to producing immunization*, by John J. Guiteras, 1902. *Departamento de Sanidad-Habana-Cuba et American medecine* II, p. 109, 1901.

3. L. P. Barreto, A. de Barros, A. G. S. Rodriguez, *Experiencias realisadas no hospital de Isolamento, Revista medica de São Paulo*, t. VI, n° 4, 28 février 1903.

4. Parker, Beyer et Pothier, *A Study of the yellow fever; Institut, Bulletin* n° 13, mars 1903

II

Dans les cas très légers, qui souvent passent inaperçus, la fièvre jaune ne diffère pas sensiblement d'un accès de fièvre paludéenne un peu long. Elle débute par de la céphalalgie, de la courbature, des vomissements alimentaires accompagnant une brusque élévation de température. Ces phénomènes sont d'autant plus accusés que les cas sont plus graves.

On trouve de l'albumine dans l'urine dès le 1er jour dans les formes graves ; le 2e ou le 3e dans les cas moyens; dans les cas légers, on n'en rencontre généralement pas. La quantité d'albumine présente marque assez bien la gravité de la maladie.

La température, après avoir atteint 39 ou 40° dès les premiers moments, descend un peu le matin du 2e jour, pour remonter à 39 ou 40° pendant les 2 jours qui suivent. La fièvre d'invasion est à peu près la même dans tous les cas; la remontée varie avec la gravité de l'atteinte. Elle dépasse rarement 40°. Si la fièvre jaune est légère, elle n'atteint même pas 39.

Au 4e jour la température baisse, et tout est fini, si la fièvre est bénigne; dans ce cas, l'urine à ce moment renferme souvent une assez forte proportion d'urates. Au 4e jour, commencent les symptômes inquiétants si la maladie est grave. La température tombe d'autant plus brusquement et d'autant plus bas que le cas est plus grave.

Dans les formes dites foudroyantes, le malade succombe brusquement peu de temps après cette chute. En général, après un moment d'amélioration apparente, la deuxième période, accompagnée ou non de fièvre, commence avec son cortège d'hémorragies et de vomissements noirs. Les gencives et la langue sont saignantes, les épistaxis peuvent être très abondantes. Le malade vomit du sang en partie digéré et présente des selles mélaniques. Les urines toujours albumineuses diminuent de quantité ou se suppriment. L'abdomen est très douloureux; la moindre pression, exercée surtout dans la région sous-ombilicale, provoque des cris plaintifs. Le malade est ictérique et le devient de plus en plus. La pression sanguine tombe, la circulation se ralentit, la peau se refroidit et devient violacée, le malade meurt en hypothermie.

Quelquefois et jusqu'à la fin, tout peut rétrocéder et le malade guérir après une longue convalescence.

II

La division de la fièvre en deux périodes est donc très légitime déjà au point de vue clinique; nous verrons plus tard qu'au point de vue de l'infection, elle ne l'est pas moins.

La première, qui dure 3 jours, est la période congestive dans laquelle les capillaires dilatés et gorgés de sang provoquent tous les phénomènes objectifs, face vultueuse, injection des conjonctives, céphalalgie, rachialgie, douleurs sciatiques. Le cœur bat vite et fort. La pression sanguine est au-dessus de la normale; elle atteint 20, 23, 25 et même 28 centimètres de mercure. Mais elle ne tarde pas à tomber pour arriver à 12, 10, 8 et même 6 centimètres au commencement de la deuxième période.

Celle-ci est une période d'insuffisance circulatoire, dans laquelle l'organisme se trouve en état d'équilibre instable à la merci d'une infection secondaire ou même d'une variation atmosphérique un peu brusque.

L'autopsie nous éclaire sur les conditions qui diminuent sa résistance. A l'ouverture du corps, un phénomène nous frappe avant tout autre. C'est la teinte jaune du foie. Cette lésion est tellement constante qu'elle peut suffire, avec la couleur ictérique et les taches livides de la peau, à permettre un diagnostic *post mortem*.

Macroscopiquement, la lésion de dégénérescence graisseuse du foie est la seule qui apparaisse nettement. A la coupe, ce foie dégénéré ne donne plus de sang, les capillaires semblent vides.

A l'examen microscopique, on constate une dégénérescence graisseuse en masse des cellules du foie qui sont augmentées de volume au point d'obturer les capillaires sanguins. Cette lésion de dégénérescence graisseuse, qui peut s'étendre à toutes les cellules épithéliales et notamment aux cellules des épithéliums glandulaires, explique très bien les phénomènes objectifs de la deuxième période. Non seulement le foie ne fonctionne plus, mais il est devenu comme une barrière interposée sur la circulation porte. C'est parce que le foie ne fonctionne plus que

l'hémoglobine n'est plus éliminée sous forme de pigments biliaires et qu'elle se fixe plus ou moins altérée dans les tissus. C'est la suppression de la circulation porte qui amène ces douleurs abdominales si vives, le ralentissement de la circulation, le refroidissement, les hémorragies intestinales, gastriques et même celles de la bouche et du nez; elle est aussi une cause de l'anurie qui est précoce quand les lésions sont considérables. C'est l'ensemble de ces phénomènes qui rend les malades si aptes aux infections secondaires et si sensibles au refroidissement de l'atmosphère.

III

Au début de nos recherches, nous connaissions déjà le premier mémoire de MM. Reed, Carroll, et Agramonte; nous savions que le virus de la fièvre jaune existant dans la circulation y était pris par le *St. fasciata*, qui, au bout de 12 jours, était capable de l'inoculer par sa piqûre. Nous savions, en outre, que la contamination par les objets souillés de vomissements noirs et autres déjections de malades n'avait pas été possible.

La similitude étiologique entre la fièvre jaune et le paludisme devait nous conduire naturellement à rechercher dans le sang des malades et dans le moustique infecté, l'agent causal de la fièvre jaune. Ces recherches, soigneusement poursuivies sans résultat, nous avaient conduits à admettre, déjà avant la publication des expériences faites à Cuba avec le sérum virulent filtré, que le microbe de la fièvre jaune devait appartenir à cette catégorie de germes dits invisibles dont on connaît maintenant un certain nombre.

Toutes nos tentatives pour infecter les animaux de laboratoire les plus divers, et même cinq espèces de singes, dont trois de l'ancien continent et deux du nouveau, sont demeurées infructueuses.

Il ne nous restait donc pas d'autre ressource que d'employer la méthode si brillamment inaugurée par les Américains et continuée avec non moins de succès au Brésil même, c'est-à-dire l'expérimentation sur l'homme.

Toutes ces expériences ont été faites avec le concours et la collaboration de MM. Oswald Cruz, directeur de la Santé publique au Brésil; Carlos Seidl, directeur de l'hôpital São Sebastião; Leão de Aquino, Antonino Ferrari et Zéphirin Meirelles, médecins des hôpitaux.

L'expérimentation sur l'homme ne nous paraissait légitime que si elle devait conduire à des résultats nouveaux et importants. Aussi nous a-t-il semblé inutile de répéter des expériences aussi démonstratives que celles de Cuba et de São Paulo. Nous avons borné notre vérification à trois expériences qui nous ont servi de point de départ pour les autres.

Les hommes qui se sont soumis à nos expériences ont été prévenus devant témoins des risques qu'ils couraient, et ils ont tous accepté librement de se prêter à nos essais. Tous étaient émigrants nouvellement arrivés au Brésil. Nous les avons éloignés de suite du foyer de contagion et installés à Pétropolis, où ils ont subi une quarantaine d'observation de 8 jours.

N° 1. — Un d'entre eux a reçu 1 c. c. de sérum prélevé 5 heures auparavant sur un cas bénin de fièvre jaune au 3e jour de la maladie. 5 jours et 5 heures plus tard, il est pris de fièvre. Sa maladie a évolué comme un cas de fièvre jaune bénin.

Il est donc bien exact que le virus circule avec le sang, le 3e jour de la maladie.

N° 2. — Un deuxième homme a été piqué par 2 moustiques infectés depuis 46 jours, sur un cas grave au 2e jour de la maladie. Il a été pris de fièvre 3 jours et 18 heures après. La maladie a évolué comme une fièvre jaune grave. Deux moustiques suffisent donc à donner une fièvre jaune sévère. Quelle est la raison de cette gravité? Il faut l'attribuer, croyons-nous, à ce que les moustiques, infectés depuis un temps très long, avaient été, en outre, gardés dans des conditions de température (27-28°) propres à favoriser leur infection. Dans les expériences de São Paulo et dans la 1re série de celles de Cuba, les moustiques employés étaient infectés seulement depuis 15-24 jours et gardés à la température du laboratoire, qui pouvait être plus ou moins favorable. Notre opinion trouve un appui dans la 2e série d'expériences de Reed, Carroll et Agramonte, où les moustiques infectés depuis plus longtemps ont donné naissance à des cas

plus graves, et aussi dans les expériences de Guiteras qui ont été suivies de 3 décès produits par des moustiques gardés 19-24 jours *à une température de* 27-28°.

Enfin, nous avons gardé pendant 14 jours nos hommes dans des pièces où avaient été disséminés les vêtements de notre premier cas. Aucun d'eux n'a été atteint. Cependant, comme nous le verrons dans la suite, la sensibilité de beaucoup d'entre eux a été vérifiée par une atteinte expérimentale ultérieure.

Ces trois points vérifiés, nous pouvions en toute sécurité entreprendre nos essais de vaccination.

Nous savions déjà par les expériences de Cuba que le sérum virulent chauffé 10 minutes à 55° était inoffensif. Nous nous sommes demandés si ce sérum chauffé n'était pas doué de propriétés immunisantes.

N° 3. — A un homme de bonne volonté, nous avons successivement injecté 5 c. c. de sérum chauffé 20 minutes à 55°; 5 jours plus tard, 10 c. c. de sérum chauffé 10 minutes à 55°, et enfin 7 jours après, 1 c. c. de sang d'un cas grave au 3e jour. Il a été pris de fièvre jaune 12 jours et 2 heures plus tard, mais cette fièvre jaune a été remarquablement bénigne.

De cette expérience, nous pouvons conclure que 10 c. c. de sérum virulent chauffé 10 minutes à 55° peuvent être injectés sans danger. En outre, étant donnée la légèreté de l'atteinte, qui, si elle n'eût été provoquée expérimentalement, n'aurait sûrement pas été diagnostiquée, on peut penser que l'injection préventive a une action efficace.

Il fallait voir si du virus chauffé moins longtemps à cette température de 55° n'était pas doué de propriétés plus actives.

Nos 4 et 5. — Deux hommes ont reçu aux mêmes dates successivement 5 c. c. de sérum chauffé 20 minutes à 55°; 7 jours plus tard, 10 c. c. de sérum chauffé 10 minutes à 55°; puis, 8 jours après, 1 c. c. de sérum maintenu 5 minutes à 55°. Ainsi préparés, nos deux hommes ont été gardés 12 jours pour vérifier qu'un chauffage de 5 minutes suffit à rendre inoffensif du sérum virulent, Cette constatation faite, l'un de ces hommes a reçu sous la peau 1 c. c. de sérum virulent, l'autre 0 c. c. 1 du même sérum provenant d'un cas mortel au commencement du 3e jour.

Dans notre expérience préliminaire, aussi bien que dans les

expériences de Cuba, il est remarquable que des quantités relativement considérables de virus n'aient donné naissance qu'à des cas bénins. On pourrait se demander si cette bénignité n'était pas due à des matières bactéricides ou préventives qui, déjà élaborées, circulaient avec le virus et étaient injectées avec lui. S'il en était ainsi, 0 c. c. 1 de sérum virulent pouvait provoquer une atteinte plus grave que 1 c. c. C'est le contraire qui a eu lieu. Celui qui avait reçu 1 c. c. de sérum virulent a eu une fièvre jaune qui s'est liquidée au bout de 8 jours et 5 heures par 14 heures de fièvre. Le n° 5, l'homme au 1/10 de c. c., n'a rien eu, et son immunité était grande, puisque, dans la suite, il s'est montré réfractaire à de nouveaux essais d'infection.

Les qualités préventives du sérum virulent chauffé sont donc plus manifestes quand ce chauffage ne dure que 5 minutes.

Le temps très court pendant lequel le sérum est maintenu à 55° semble suffire à tuer les germes, car l'injection ne donne lieu à aucune réaction, ce qui se produirait sans doute si le virus n'était qu'atténué. Cependant, on pouvait croire que les injections préalables de sérum chauffé plus longtemps avaient préparé l'organisme et empêché cette réaction de se produire. Il n'en est rien, car un homme (n° 6) inoculé pour la première fois avec la même quantité (1 c. c.) de sérum provenant d'un cas bénin au 1er jour de la maladie et chauffé 5 minutes à 55° n'a présenté aucune variation de température.

Si notre expérience nous a montré les qualités du sérum chauffé, elle ne nous a pas éclairé sur la présence des substances préventives qui pourraient se trouver dans le sang des malades. Il nous fallait chercher un autre moyen d'information. Nous savons que les microbes, dits invisibles, sont des germes qui traversent les bougies filtrantes. Ils les traversent d'autant plus facilement que le grain est moins serré et que les matières albuminoïdes dans lesquelles ils sont contenus, sont plus diluées. Partant de ce principe et sachant que le microbe de la fièvre jaune traverse les filtres siliceux quand on dilue le sérum de son volume d'eau distillée ou d'eau physiologique, nous avons opéré une filtration rapide sur bougie de porcelaine Chamberland, marque F., sans diluer le sérum.

Bien entendu, l'étanchéité de nos bougies a été vérifiée. Elles

n'ont pas laissé passer un très fin coccus que nous avons employé comme test.

Par cette opération nous espérions retenir le microbe et ne laisser passer que les anticorps. Le résultat de l'expérience n'a pas répondu à nos espérances. Il nous a paru au contraire que le filtre laisse passer le microbe plus facilement que les anticorps. Le sérum qui provenait d'un cas léger a donné naissance à un cas plus grave que celui qui avait été provoqué par le sérum non filtré.

Cette expérience, renouvelée 2 fois, a donné 2 fois le même résultat. L'un des cas (nº 7) s'est produit 5 jours et 18 heures après l'injection de 1 c. c. du sérum filtré d'un cas grave au commencement du 3e jour de la maladie; l'autre (nº 8) est survenu 12 jours et 18 heures après l'injection de 1 c. c. du sérum filtré d'un cas grave au 2e jour.

Cette incubation de plus de 12 jours que nous avions déjà constatée n'est donc pas absolument rare. Nous avons eu l'occasion de voir que l'infection naturelle peut aussi présenter une incubation aussi longue [1].

Puisque le microbe traverse la bougie de porcelaine F, nous avons essayé de l'arrêter avec la bougie beaucoup plus fine, marque B. L'injection du sérum d'un cas grave au commencement du 2e jour filtré sur cette dernière n'a donné aucune réaction. Mais malheureusement nous n'avons pas pu vérifier la sensibilité de notre sujet nº 9.

N'ayant pas réussi à séparer les anticorps des microbes, nous avons cherché à n'employer qu'une quantité minimale des uns et des autres. Sur une écorchure de la peau produite par un grattage qui enlevait l'épiderme sur 1 centimètre carré de

1. Il nous suffira de rapporter deux cas de ce genre.

L'un s'est produit chez un jeune homme de 18 ans que nous avons pu observer. Ce jeune homme, domestique d'un médecin, a été pris de fièvre jaune 10 jours après être arrivé à Pétropolis, ville indemne, et être parti de Rio-de-Janeiro point où il s'était infecté. Il y avait 12 jours qu'il avait quitté la maison dans laquelle une servante du même médecin avait été atteinte de fièvre jaune. Il est mort avec vomissements noirs. Le 2e est le cas d'une fillette de 12 ans que son père avait envoyée à Pétropolis 10 jours auparavant pour la mettre à l'abri de la fièvre jaune qui venait de frapper sa femme et ses 3 autres enfants. Elle est morte avec les symptômes caractéristiques de la maladie.

Enfin, à bord d'un bateau des Messageries maritimes revenant en Europe, qui avait pris des passagers à Rio-de-Janeiro, il s'est déclaré parmi ces derniers un cas isolé de fièvre jaune entre Dakar et Lisbonne, c'est-à-dire du 9e au 14e jour.

surface environ, nous avons déposé une grosse goutte de sérum virulent que nous avons laissé sécher. Cette inoculation n'a donné lieu à aucune maladie chez les sujets n°s 10 et 11. Une pareille porte d'entrée n'est donc pas suffisante pour donner une maladie atténuée; nous n'avons malheureusement pas pu vérifier si elle donnait l'immunité.

Nous avons alors songé à donner une goutte de sérum sous la peau. Une goutte formant une quantité très variable, nous nous sommes arrêtés à cette quantité de 1/10 c. c. que nous avions déjà inoculée.

Pour plus de sécurité, nous avons tout d'abord fait l'expérience sur un homme n° 12, auquel un séjour déjà long à Rio, sans maladie caractérisée au moins d'après lui, avait cependant pu donner une immunité relative. Cet homme n'a rien présenté à la suite de cette injection.

Nous avons alors répété la même opération chez un émigrant récemment arrivé, n° 13. Ce dernier a pris au bout de 4 jours et 18 heures une fièvre jaune moyenne. 1/10 de centimètre cube de sérum provenant d'un cas bénin à la fin du 1e jour de la maladie, est donc une dose suffisante pour donner la maladie avec un caractère qui ne permet pas de préjuger de sa constante bénignité.

Il était dès lors prudent de renoncer à chercher de ce côté un mode de vaccination et il était préférable de revenir en arrière. Le traitement du virus par la chaleur nous ayant donné des résultats encourageants, il fallait voir si d'autres moyens d'atténuation ou de destruction n'étaient pas applicables. Quelle pouvait être l'action du vieillissement sur le virus?

Après avoir gardé dans un tube à essais, bouché au coton, du sérum virulent d'un cas grave au 1er jour, à la température du laboratoire, 24-30°, et à l'obscurité pendant 48 heures, nous en avons inoculé 1/10 c. c., dose suffisante, comme nous savons, pour donner la maladie.

Notre homme n° 14 est resté en bonne santé. Piqué ensuite par 2 moustiques infectés depuis 40 jours qui, 6 jours plus tard, ont donné la fièvre jaune, il n'a rien eu. Nous le supposions donc immunisé. Cependant une injection de 1 c. c. de sérum virulent provenant d'un cas grave au 2e jour, donné plus tard, a provoqué chez lui au bout de 2 jours 21 heures une maladie assez grave.

Puisque cet homme était sensible, nous pouvons donc induire de ces expériences que la piqûre de moustiques infectés ne donne pas fatalement la fièvre jaune; que cette piqûre, quand elle est restée sans résultat, ne protège pas contre une infection ultérieure. Enfin, elle nous montre que 48 heures suffisent à tuer le microbe de la fièvre jaune dans les conditions où nous l'avons conservé.

Au lieu de garder le virus dans le sérum, voyons ce qu'il devient quand nous le maintenons en tubes à essais dans le sang défibriné sous huile de vaseline, à l'obscurité et à la température du laboratoire 24-30°.

A un homme de bonne volonté, n° 15, nous avons commencé par donner du sang vieilli, dans ces conditions, pendant un mois. Cette injection n'a été suivie d'aucun effet. Une deuxième de 5 c. c, également donnée 5 jours plus tard avec du sang vieux de 15 jours n'a pas donné plus de résultat. Une troisième injection de 5 c. c. de sang de 5 jours provenant d'un cas mortel au 2e jour, faite 5 jours après la deuxième, a été suivie, 2 jours et 20 heures plus tard, d'une atteinte très bénigne de fièvre jaune.

Il y avait donc, dans nos liquides, du virus vivant; mais atténué ou mélangé à des substances préventives. Mais quelle était l'injection qui avait provoqué la maladie? pendant combien de temps ce virus qui ne vit pas 48 heures dans les conditions de la première expérience se conserve-t-il dans les conditions de la deuxième?

Pour le savoir, nous avons inoculé 2 individus, nos 16 et 17, l'un avec 5 c. c. de sang vieux de 1 mois, l'autre avec la même quantité de sang vieux de 12 jours. En 15 jours ni l'un ni l'autre n'ont été malades. Le deuxième, n° 17, a, en outre, reçu du sang de 8 jours sans plus de résultat. Cependant il était sensible puisque 16 jours plus tard il a été piqué par trois moustiques[1] qui lui ont donné, au bout de 3 jours et 22 heures, une fièvre jaune extraordinairement bénigne

Nous pouvons donc dire que le virus se conserve dans le sang défibriné et dans les conditions indiquées plus haut, au moins 5 jours, mais qu'au bout de 8 jours il a cessé d'être actif. Nous devons ajouter que cette expérience confirme la première

1. Le premier de ces moustiques avait été infecté 23 jours auparavant sur un cas bénin au 3e jour de la maladie; le 2e, 17 jours auparavant sur un cas léger au 3e jour; le 3e, 30 jours auparavant sur un cas grave du 2e jour.

en ce qui concerne les substances immunisantes contenues dans les mêmes liquides.

Tout le sang défibriné qui a servi à nos expériences, comme d'ailleurs le sérum virulent que nous avons employé, a été recueilli pendant les 3 premiers jours de la maladie, époque à laquelle notre expérience préliminaire nous avait indiqué que le virus circulait avec le sang. Mais il était important de savoir combien de temps le microbe se conserve dans le sang chez le jauneux, pendant combien de temps, en somme, un malade est capable d'infecter les moustiques.

Un homme, n° 18, a reçu 6 c. c. d'un sérum de malade au 8e jour d'une fièvre jaune grave, étendu de 5 fois son volume d'eau physiologique et filtré au Berkefeld. Il n'a pas été malade.

Cette filtration, qui n'était pas de nature à arrêter les germes de fièvre jaune, avait pour but de débarrasser le sérum des microbes d'infection secondaire, s'il s'en était trouvé.

De même 3 hommes ont reçu du sérum du 4e jour de la maladie provenant l'un d'un malade avec fièvre élevée (40°) et hémorragies, l'autre d'un malade en hypothermie avec glossorrhagie commençante et qui est mort dans la suite; le troisième d'un malade avec fièvre légère (38°,4). Le premier de ces sérums avait été filtré au Chamberland F et nous savons que cette opération n'arrête pas le microbe, le second, étendu de 4 fois son volume d'eau physiologique, avait été passé sur Berkefeld, le troisième n'avait pas été filtré du tout. Le premier homme, n° 19, avait reçu 4 1/2 c. c. de sérum, le deuxième, n° 20, 1 c. c., le troisième, n° 21, 1/2 c. c. Aucun d'eux n'a été malade.

La sensibilité de deux de ces hommes n'a pu être vérifiée, mais le n° 20 a pris ultérieurement la fièvre jaune 5 jours et 22 heures après avoir été piqué par 3 moustiques infectés [1].

Il n'y a donc plus de microbes dans le sang à partir du 4e jour de la maladie.

Une disparition si brusque de microbes si nombreux ne doit pas se produire sans qu'il reste dans le sérum des anticorps actifs. C'est ce que nous a permis de vérifier l'expérience suivante.

Un homme n° 22 a reçu préventivement 30 c. c. d'un sérum

1. Le 1er et le 2e de ces moustiques avaient été infectés 21 jours auparavant sur un cas bénin au 3e jour; le 3e, 27 jours auparavant sur un cas grave au 2e jour.

de malade grave au 8e jour, filtré au Berkefeld après avoir été étendue de 5 fois son volume d'eau. Cette filtration avait pour but d'éliminer les microbes d'infection secondaire. 6 jours plus tard, il a reçu encore 20 c. c. du même sérum non filtré. Le lendemain il a été piqué par un moustique infecté[1] et 8 jours plus tard par un autre, sans résultat. 17 jours après cette piqûre, il est piqué à nouveau par 4 moustiques infectés. 7 jours et 5 heures après, il prend la fièvre. Celle-ci a été très bénigne.

Le sérum préventif avait donc probablement protégé cet homme contre les deux premières tentatives d'infection. 26 jours après l'injection, l'action du sérum était encore suffisante pour atténuer la gravité de la maladie.

Nous disons que le sérum s'est montré *probablement* préventif contre les premières piqûres, parce que nous n'avons pas de moyens de vérifier qu'un moustique est infecté le jour où on le fait piquer, et parce que d'autre part nous savons que la piqûre d'un moustique infecté peut rester sans effet.

Aussi avons-nous fait avec le sérum virulent une expérience parallèle.

Un homme de bonne volonté, nº 23, a reçu 20 c. c. du même sérum que le précédent provenant d'un malade au 8e jour. Le même jour on lui a injecté 1/2 c. c. de sérum virulent provenant d'un cas benin au commencement du 3e jour. Cette injection n'a été suivie d'aucun résultat.

Enfin, un 3e individu, nº 24, a été piqué sans résultat par deux moustiques infectés[2] après avoir reçu 15 c. c. de sérum de convalescent.

Le sérum de convalescent et même celui d'un malade au 8e jour jouissent donc de propriétés nettement préventives.

Ces propriétés préventives se manifestent encore d'une façon peut-être plus nette dans l'expérience suivante.

Deux hommes, nºs 25 et 26, ont reçu, le même jour, 1 c. c. de sérum virulent provenant d'un cas grave au 2e jour de la

1. Celui-ci avait infecté 14 jours auparavant sur un cas bénin au 2e jour de la maladie. Celui qui a été employé ensuite avait piqué, 14 jours avant, un cas léger au 1er jour. Les 4 derniers ont été infectés, l'un 31 jours avant sur un cas léger au 1er jour, les 3 autres, 26 jours auparavant sur un cas léger au 3e jour.

2. Ces deux moustiques avaient piqué un cas grave au 2e jour, 23 jours auparavant.

maladie et en même temps que le nº 14. Au moment où ce dernier a été pris de fièvre jaune, c'est-à-dire 3 jours et 2 heures plus tard, les deux autres ont reçu 20 c. c. de sérum de convalescent. Ni l'un ni l'autre n'a été atteint.

Le sérum de convalescent est aussi doué de propriétés thérapeutiques, comme nous avons pu nous en rendre compte dans 11 expériences faites à l'hôpital. Ces essais de traitement ont été suivis de 7 succès et de 4 insuccès; mais il convient de dire pour la défense de cette statistique peu démonstrative qu'il ne faut pas s'attendre à des résultats bien meilleurs dans les conditions où nous avons opéré. En effet, nous avons pris les convalescents tout venant, sans faire d'essai préalable sur la valeur préventive de leur sérum. Or, chez l'homme comme chez le cheval, il doit se trouver des sujets qui donnent des sérums plus ou moins bons et même des sérums inactifs. Mais, dans deux cas notamment, nous avons pu voir se produire une amélioration si subite et si imprévue, que nous sommes prêts à reconnaître une valeur curative à certains sérums.

Toutes nos expériences ont été faites sans témoins et il ne faut pas nous en blâmer, car, à notre avis, on ne peut pas se permettre de faire des témoins quand ce sont des hommes qui sont en expérience. Mais nous nous sommes en général efforcés de n'obtenir qu'une immunité relative, dans les essais de vaccination que nous avons faits, pour pouvoir établir que les hommes traités étaient bien réellement sensibles. Mais pour opérer ainsi, il fallait s'assurer que l'immunité acquise par une première atteinte était assez longue et assez solide pour éviter toute réaction à la suite d'une injection virulente. En d'autres termes, il était indispensable de fixer que la bénignité de l'atteinte des hommes en expérience n'était pas due à une fièvre jaune antérieure.

Nous avons, à cet effet, inoculé à un homme, nº 27, qui, 8 mois auparavant, avait eu une fièvre jaune authentique, 1 c. c. de sérum virulent provenant d'un cas moyen au commencement du 2e jour de la maladie. Cette injection n'a provoqué aucune réaction.

Nous sommes donc autorisés à regarder comme valables les conclusions que nous avons tirées de nos expériences.

On nous pardonnera de les avoir généralisées malgré le

petit nombre de celles-ci, étant donné qu'elles ont été faites sur l'homme.

IV

On sait, depuis les expériences de Reed, Carroll, Agramonte et Lazear, que la fièvre jaune est inoculée à l'homme par la piqûre du *Stegomya fasciata*.

Cette confirmation expérimentale de la doctrine déjà ancienne du Dr Finlay dirige dans une voie nouvelle les efforts tentés en vain jusque-là, pour lutter contre la fièvre jaune dans les pays où elle sévit.

A Rio-de-Janeiro nous avons institué une série de recherches et d'expériences ayant pour objet de déterminer :

Si le stegomya est dans la nature l'agent de transmission et s'il est seul ;

Quelles sont les conditions qui favorisent l'apparition, la multiplication et la disparition de ce moustique;

Quelles conditions sont nécessaires pour qu'il puisse s'infecter et transmettre la maladie;

Par quels moyens l'homme peut se protéger contre le moustique infecté.

Mœurs du Stegomya fasciata.

Le *St. fasciata* est assez connu depuis les recherches des médecins américains pour que nous puissions nous dispenser d'en donner une description détaillée. C'est un moustique d'un genre extrêmement voisin du Culex dont il a été séparé par Théobald, peut-être à tort[1].

Parmi les 16 espèces que compte le genre *Stegomya*, le *St. fasciata* est de beaucoup le plus répandu dans les contrées chaudes du globe. La zone où on le rencontre est comprise entre 40° de latitude nord et 40° de latitude sud. Ce moustique mesure 4 à 5 millimètres de longueur, il est brun foncé, presque

1. En effet, le seul caractère invoqué pour différencier les deux genres consiste en la présence, sur toute la tête et sur le scutellum des Stegomya, d'écailles plates et larges qui ne se rencontrent pas sur le scutellum et n'existent que sur les côtés de la tête chez le culex. Un autre caractère différentiel invoqué est le fait que les stegomya pondent des œufs isolés, tandis que les œufs de culex sont soudés en une petite masse ayant l'apparence d'un rayon de miel; comme diverses espèces de culex pondent leurs œufs isolément à la façon des stegomya, ce caractère ne saurait être retenu.

noir (le mâle en particulier), avec des zébrures et des points blancs argentés sur tout le corps. Si on l'examine par sa face dorsale en le disposant de manière que sa tête soit tournée vers soi, on remarque que les zébrures blanches du thorax et de la tête dessinent très élégamment une lyre à deux cordes, dont le pied est à la tête de l'insecte. Ce dessin typique permet de reconnaître au premier coup d'œil le *St. fasciata* et de le distinguer de tous les autres culicides.

Les mœurs du *St. fasciata* diffèrent à beaucoup d'égards de celles de la plupart des moustiques. L'un des traits les plus saillants de l'espèce est son extrême sensibilité aux différences de température. Pour peu qu'on l'observe, on est frappé du contraste entre sa grande activité lorsque le thermomètre indique environ 28°, point où il manifeste son maximum d'énergie, et son inactivité à des températures de quelques degrés au-dessus ou au-dessous de ce point. Il meurt au delà de 39°. Si le thermomètre s'abaisse au-dessous de 15° à 16°, il devient paresseux et cesse de s'alimenter. Vers 12° à 14°, il est engourdi, vole avec difficulté et ne se tient plus solidement sur ses pattes. C'est donc un moustique essentiellement thermophile qui, dans tous les actes de sa vie, est impressionné par l'état thermique de l'atmosphère.

Nous avons multiplié les expériences pour étudier l'action de la température sur tous les stades de son existence et sur les actes qui se rapportent à sa multiplication, l'accouplement, la succion du sang, la ponte, l'évolution des larves et la métamorphose en insecte parfait.

Accouplement. — Deux fois seulement nous avons eu l'occasion d'observer l'accouplement : il a lieu presque toujours dans la nuit et à l'obscurité, d'où la rareté des observations de ce genre. D'après les deux cas où il s'est effectué sous nos yeux, voici comment il s'opère : le mâle saisit la femelle au vol, se place contre elle ventre à ventre, se maintient dans cette position au moyen de ses pattes accrochées au thorax de sa compagne et en fixant ses crochets au voisinage de la vulve. Le contact a duré dans un cas une minute environ, dans l'autre à peine une demi-minute. Pendant cette durée, les deux individus continuaient de voler.

Aussitôt après la dernière métamorphose, en sortant de la

pupe, le mâle et la femelle sont prêts pour l'accouplement sans qu'il leur soit nécessaire de s'alimenter d'abord. C'est normalement le premier acte qu'ils accomplissent une fois passés à l'état d'insectes parfaits.

Si, pendant la nuit qui suit la métamorphose, on place sous une même moustiquaire des mâles et des femelles et qu'on les sépare le lendemain, on constate qu'un nombre plus ou moins considérable de femelles ont été fécondées suivant que la température était plus ou moins chaude au moment où elles ont été en contact avec les mâles.

Lorsque la température est élevée, c'est-à-dire dépasse 25°, il est exceptionnel que des femelles aient échappé à l'accouplement : on en a la preuve en ce que toutes pondent au bout de quelques jours. Si la température est entre 20 et 25°, la fécondation est encore la règle et la proportion de femelles incapables de pondre est très faible. Mais lorsque la température s'abaisse au-dessous de 20°, la proportion des femelles non fécondées devient de plus en plus considérable.

L'expérience suivante met en évidence cette influence de la température sur l'accouplement :

Sur un lot de 20 *St. fasciata* femelles sorties des pupes le même jour, 10 ont été placées sous une moustiquaire dans notre laboratoire à Rio, en compagnie de 17 mâles. Les 10 autres ont été transportés à Pétropolis isolées dans des tubes et réunies le soir sous une moustiquaire avec 17 mâles. Le lendemain toutes ces femelles ont été séparées des mâles, isolées dans des tubes de verre et mises à piquer sur l'homme. A Rio, la température du laboratoire au moment où ces femelles ont été réunies avec des mâles était de 29°, et la température moyenne de cette nuit a été de 27°. A Pétropolis, la température de la nuit de l'accouplement a été de 19° jusqu'à 2 heures du matin et s'est abaissée à 16 vers 5 heures, soit une température moyenne de 17°.

Toutes les femelles mises en expérience à Rio ont fait leur ponte au bout de quelques jours. Des 10 femelles mises en expérience à Pétropolis et ramenées le jour suivant à Rio, 4 seulement ont pondu. Par conséquent 6 d'entre elles n'avaient pas été fécondées. Dans d'autres expériences du même genre les proportions ont varié, mais d'une façon générale entre 15° et

20° la proportion de femelles non fécondées a été en rapport avec l'abaissement de la température.

L'accouplement est donc favorisé par une température élevée, c'est entre 25 et 30° qu'il s'opère dans les meilleures conditions.

Piqûres. — Le *St. fasciata* est un des moustiques les plus gênants pour l'homme à cause de ses piqûres. Le mâle, bien que sa trompe soit pourvue de stylets, ne pique jamais ; seule la femelle est capable de piquer les animaux. Elle le fait de jour et de nuit dans des conditions que nous examinerons plus loin.

Très peu après sa métamorphose, une femelle est susceptible de piquer. En général, c'est au bout de 24 heures qu'elle y consent facilement. Dans la nature, il est rare qu'elle n'ait pas été accouplée au préalable et la fécondation paraît stimuler son besoin de sang. Néanmoins les femelles vierges sont aptes à piquer, comme le montre cette expérience :

Un lot de huit femelles métamorphosées du même jour entre 1 et 3 heures du soir ont été aussitôt isolées.

Ces huit femelles vierges ont refusé de piquer le même soir à 9 heures.

Toutes ont également refusé le lendemain à 10 heures du matin et à 2 heures du soir. 2 ont piqué le surlendemain à 10 heures du matin. Les 6 qui avaient refusé le matin ont piqué le même jour à 9 heures du soir, 54 heures après la métamorphose.

Les femelles accouplées sont généralement plus empressées à piquer. Comme pour beaucoup d'autres espèces, l'ingestion de sang est indispensable pour que les œufs arrivent à se développer. C'est donc une condition essentielle de la reproduction. Si une femelle a sucé du sang soit avant, soit après l'accouplement, elle pondra régulièrement au bout de quelques jours. Si au contraire, elle est empêchée de piquer, la ponte ne peut avoir lieu. Pour que la ponte soit possible, il importe peu que le sang ait été ingéré fort avant ou après l'accouplement : une femelle accouplée sans avoir ingéré de sang et nourrie avec des substances sucrées demeure inféconde tant qu'elle est soumise à ce régime ; mais si, au bout d'un certain temps, de 15 ou 20 jours par exemple, on la fait piquer, elle pondra ses œufs après un intervalle de quelques jours, sensiblement égal à celui

qui se serait écoulé entre la piqûre et la ponte si elle avait piqué aussitôt après la fécondation.

L'expérience suivante le démontre :

Un lot de 10 *St. fasciata* femelles ayant subi la métamorphose dans le courant d'un même jour a été placé dans une moustiquaire en compagnie de 15 mâles.

48 heures après, 3 de ces femelles ont été retirées de la moustiquaire, placées dans des tubes de verre, et on les a fait piquer sur l'homme.

Ces 3 femelles ont pondu, l'une après 4 jours, les 2 autres après 6 jours.

Les 7 autres, nourries avec du miel, sont demeurées en compagnie des mâles pendant 11 jours sans qu'aucune ponte ait eu lieu. Au 11e jour, 6 femelles ont été isolées dans des tubes de verre et 1 laissée avec les mâles. Ni celle-ci ni les autres n'ont pondu dans les 7 jours qui ont suivi. A ce moment, c'est-à-dire au 18e jour de l'expérience, la femelle demeurée avec les mâles et 2 des 6 femelles isolées ont été mises à piquer sur l'homme.

Ces 3 femelles ont pondu 5 jours après la piqûre, tandis que les 4 qui n'avaient pas piqué sont demeurées inféconde et ont terminé leur existence sans avoir pondu.

Les mêmes phénomènes s'observent si, au lieu de sang humain, le *Stegomya* absorbe celui d'un autre animal à sang chaud; mais il est à considérer que ce moustique pique de préférence l'homme et manifeste une répulsion plus ou moins grande pour n'importe quel autre animal.

Ceci dit concernant le rôle de la succion du sang dans la reproduction, nous devons examiner l'influence de la température sur l'aptitude plus ou moins grande à piquer du *St. fasciata*.

Si dans les 48 heures qui suivent sa naissance on prend une femelle qui a été accouplée, mais n'a pas encore piqué, et qu'on la place dans une chambre où un sujet est exposé à sa piqûre, on observe :

Qu'entre les températures de 26 à 35°, à toute heure de la journée, mais surtout à partir de 11 heures du matin, le moustique se précipite sur l'homme et le pique avec avidité;

Qu'entre les températures de 19 à 25°, il manifeste une

ardeur beaucoup moins vive et ne s'empresse plus de la même manière d'attaquer sa victime. Souvent il s'immobilise sur les parois de la pièce, sans paraître songer à piquer ;

Qu'entre les températures de 14 à 18°, non seulement, lorsqu'il est ainsi en liberté, il ne cherche point à piquer, mais même que si on le met en contact avec l'homme en l'introduisant dans un tube de verre qu'on applique sur la peau, il refuse de piquer. Lorsqu'il le fait, c'est au bout d'un temps assez prolongé pour que la température du tube se soit élevée au contact de la main qui la maintient.

C'est ainsi qu'un lot de 12 moustiques, placés dans des tubes de verre et appliqués sur le bras par une température ambiante de 14°, sont restés 15 minutes au contact de la peau sans vouloir piquer.

La même expérience faite à 17° a donné le même résultat.

A la température de 18°, 9 de ces mêmes moustiques ont piqué, les uns au bout de 5, d'autres au bout de 7 et d'autres au bout de 8 minutes.

Nous ne croyons pas que, dans la nature, le *St. fasciata* livré à lui-même, dans une atmosphère de 17° et au-dessous, cherche jamais à piquer. On constate qu'il pique assez volontiers entre 22 et 25°. La température de 27 à 30° est celle qui lui convient le mieux.

Ponte. — Après s'être repue de sang, la femelle fécondée du *St. fasciata* recherche le voisinage de l'eau pour effectuer sa ponte et, le moment venu, elle se pose soit au bord et plus souvent sur la surface même de la petite nappe d'eau qu'elle a choisie. La ponte s'effectue en général pendant la nuit, néanmoins nous avons vu nombre de femelles en captivité pondre durant la journée. Cette ponte dure plusieurs heures. Les œufs sont déposés isolément à la surface de l'eau et restent en général groupés. Ils flottent tant que l'eau n'est pas agitée, toutefois ils peuvent être très facilement submergés et leur éclosion s'en trouve ordinairement retardée ; il arrive même qu'une partie des œufs submergés ne peuvent éclore, surtout si la température de l'eau est peu élevée. Une femelle pond ordinairement de 70 à 80 œufs ; nous avons observé des pontes de 95 et plus. Certaines femelles de petite taille, qui ont été insuffisamment nourries à l'état larvaire ou dont l'évolution à cette période a

été lente, pondent un nombre d'œufs plus faible, 50 à 60, quelquefois moins.

Selon la température régnante la ponte est hâtée ou ralentie. Nous avons observé que la température de 27 à 28° pendant la nuit, avec un maximum de 29 à 30° dans la journée était la plus favorable pour hâter la ponte. Dans ces conditions, elle a lieu souvent 48 heures après la piqûre, presque toujours le 3e jour, quelquefois le 4e.

Si les températures nocturnes sont en moyenne de 25° à 27°, la ponte a lieu du 4e au 5e jour.

Si elles se maintiennent entre 20° et 25°, la ponte a lieu le plus souvent au 6e jour, quelquefois au 7e ou au 8e.

Si elles se maintiennent au-dessous de 20° avec un maximum diurne de 22° à 23°, la ponte peut être retardée jusqu'à 26 et 27 jours; parfois même elle ne s'accomplit pas. Il est à remarquer que c'est la température nocturne qui agit surtout pour hâter ou ralentir la ponte. De même aussi, c'est la température nocturne qui exerce la plus grande influence sur l'accomplissement des fonctions de la *St. fasciata*. C'est qu'en effet, à part le besoin de piquer qui tourmente les jeunes femelles pendant la journée, c'est surtout à la faveur de l'obscurité et pendant la nuit que s'accomplissent les fonctions les plus importantes de l'existence de cette espèce.

Éclosion. — Plus encore que la ponte, l'éclosion est influencée par la température. Dans des conditions favorables, l'œuf éclôt au bout d'un laps de temps très court, souvent au 2e ou au 3e jour après la ponte. Ces conditions favorables sont, comme pour l'accouplement et la ponte, une température moyenne de 27° à 29°. La température optima pour tous les actes de la vie de ce moustique est, d'après nos observations, 28°.

Si les œufs sont maintenus à une température de 25° à 26°, l'éclosion a encore lieu rapidement, du 4e au 5e jour en moyenne. S'ils sont maintenus à une température de 20° à 25°, l'éclosion commence parfois vers les 5e, 6e ou 7e jour, mais elle ne s'opère plus avec la même régularité. Alors qu'à des températures plus élevées la totalité ou la presque totalité des œufs éclosent à la fois, ou tout au moins dans l'espace de quelques heures, l'éclosion au-dessous de 25° est en général partielle; on voit apparaître quelques larves, mais une partie des œufs, souvent la

presque totalité, restent fermés, attendant pour s'ouvrir un relèvement de la température. Ils peuvent demeurer ainsi immobilisés pendant plus d'un mois et fréquemment pendant cet intervalle cessent de flotter, pour couler à fond.

Une température d'au moins 20° est nécessaire pour que l'œuf puisse éclore, toutefois il peut supporter sans souffrir des températures beaucoup plus basses, y compris celle de 0°. Mais si le refroidissement ne tue pas l'œuf d'ordinaire, du moins il a un retentissement défavorable sur toute l'évolution du moustique. Dans la nature, il suffit que la température du milieu s'abaisse à 20° pendant une nuit pour que l'éclosion et l'évolution des larves soient troublées et retardées. Les œufs qu'on laisse à une température basse, de 0° à 20°, se conservent ainsi fort longtemps, et si on les reporte ensuite à une température convenable ils peuvent éclore. Néanmoins si l'expérience se continue pendant plusieurs mois, il y a un déchet considérable. Dans une expérience de ce genre prolongée 70 jours avec des températures noctures de 10° à 20°, à peine 1/20 des œufs reportés à une température favorable à l'éclosion ont donné des larves. Nous croyons par suite que tous les œufs soumis au refroidissement doivent périr au bout d'une période de plusieurs mois. L'immersion prolongée des œufs à température basse nous a paru une condition défavorable à leur longue conservation, soit que les œufs soient attaqués par les microbes développés dans l'eau, soit que leur coque se laisse à la longue ramollir et pénétrer par l'eau [1].

La conservation de l'œuf est mieux assurée s'il subit la dessiccation que s'il reste immergé. Nous avons, au lendemain de la ponte, retiré des œufs de l'eau pour les mettre à sec dans un tube de verre. Après les avoir gardés durant 42 jours à une température qui empêchait l'éclosion, ils ont été remis dans l'eau et exposés à une température d'environ 27°. Une partie sont éclos 5 jours plus tard, d'autres après le 6e et le 7e jour; toutefois plus de la moitié avaient péri. D'autres observateurs

1. Les œufs morts à la suite de l'immersion prolongée ne restent pas intacts ordinairement. Très souvent ils s'ouvrent, mais non plus par le même mécanisme que l'œuf qui éclôt. La coque de l'œuf qui éclôt subit une scission transversale du côté de sa grosse extrémité, presque au 1/4 de sa longueur, formant ainsi une calotte qui se rabat à la façon du couvercle d'une boîte ou se détache en totalité, pour donner issue à la jeune larve. L'œuf mort au contraire se fend dans le sens de la longueur et il se détache une lanière longitudinale de la coque.

ont constaté que la dessication pouvait être prolongée 3 mois sans amener la mort des œufs.

Évolution des larves. — L'évolution de la larve du Stegomya a une durée variable, suivant les conditions plus ou moins favorables dans lesquelles s'est opérée l'incubation de l'œuf, suivant la richesse alimentaire de l'eau où elle s'élève et surtout suivant la température à laquelle elle est soumise. C'est dans les eaux croupissantes ou tout au moins non courantes que le *St. fasciata* a l'habitude de déposer sa progéniture. Hôte des habitations humaines, il choisit de préférence les dépôts d'eau qui se rencontrent à l'intérieur et au voisinage des maisons, les caisses à eau, les gouttières, les vases à fleurs, les carafes, les alcarazas, les égouts d'évier, les baquets, les bassins d'arrosage et de lavage, les vieilles boîtes à conserves et les tessons de vaisselle abandonnés dans les cours. Ses larves en effet, susceptibles de se développer dans l'eau claire, ne craignent pas les eaux sales. Les eaux renfermant des débris alimentaires, des matières amylacées ou des matières grasses leur conviennent parfaitement; la Commission américaine à Cuba a constaté que la souillure de l'eau par des matières fécales favorise leur développement. Il nous paru que l'eau de pluie, probablement à raison des microbes qui y pullulent, leur était, plus que l'eau de source, un milieu favorable. Au laboratoire elles sont faciles à élever dans l'eau où l'on a placé quelques graines féculentes, grains de maïs, de blé, etc.

Elles se plaisent moins dans les eaux vaseuses et dans celles où ont macéré en abondance des feuilles mortes et des débris de bois. Les différences qui existent dans la durée d'évolution des larves placées en ces divers milieux ne sont pas d'ordinaire extrêmement marquées. C'est plutôt la vigueur et le volume de l'insecte parfait qui sont en rapport avec la richesse et l'adaptation alimentaires du milieu où il a vécu son stade larvaire.

Il existe au contraire un rapport étroit entre la température à laquelle se fait l'élevage et la rapidité d'accroissement des larves. A Rio, pendant la saison la plus favorable, celle où les températures nocturnes sont en moyenne de 26° à 27° et les températures diurnes de 28° à 31°, nous avons vu les larves de *St. fasciata* arriver au stade de pupe 7 jours après l'éclosion et au stade parfait le 9e jour; toutefois, la plupart des larves de la

même ponte n'ont formé les insectes parfaits qu'au 10e jour. Pour que l'évolution s'accomplisse avec cette rapidité, il est nécessaire que l'œuf ait comme la larve rencontré une température favorable et que son incubation ait été rapide. La Commission américaine a constaté que l'évolution du stegomya à Cuba, depuis la ponte jusqu'à l'état parfait, demandait en moyenne 15 à 18 jours. Nous avons vérifié qu'elle s'effectuait à Rio-de-Janeiro dans un laps de temps analogue pendant la saison la plus chaude seulement, saison qui dure de janvier à mai. Elle est plus longue, dans les conditions naturelles, pendant les autres périodes de l'année.

Enfin, avec des températures noctures inférieures à 22°, nous avons vu à Pétropolis les larves mettre 40 à 60 jours, à compter de l'éclosion, pour se transformer en pupes, et demeurer à cet état 3 à 5 jours avant de devenir insectes parfaits. D'ordinaire ce stade de pupe dure 30 à 50 heures.

Les larves ne périssent pas à des températures voisines de 0°, mais elles s'accroissent très lentement et mettent un temps indéterminé à atteindre l'état parfait.

En terminant cette brève étude des larves de *Stegomya*, nous devons signaler que leur développement est possible dans l'eau saumâtre et que l'eau de savon est un des milieux qui leur sont le plus nuisibles.

Nous avons constaté expérimentalement que les larves placées dans l'eau de mer périssent rapidement. Mais il n'en est pas de même si l'eau de mer est étendue d'eau douce.

Une femelle placée dans un tube contenant de l'eau saumâtre composée de 5/6 d'eau douce et de 1/6 d'eau de mer a pondu ses œufs dans les conditions normales. Ces œufs ont éclos au bout de 4 jours. Les jeunes larves transportées dans un vase contenant la même eau se sont développées, elles ont atteint le stade de pupe au 11e jour et le stade parfait au 13e jour. Il en a été de même pour des larves placées dans une eau saumâtre artificielle contenant 1/5 d'eau de mer pour 4/5 d'eau douce. Deux jeunes larves placées dans une eau saumâtre contenant 1/3 d'eau de mer sont mortes au bout de quelques heures.

En ce qui concerne l'action de l'eau de savon, nous avons observé que des larves de n'importe quel âge, placées dans une

eau contenant en dissolution 1/1000 de son poids de savon de Marseille, meurent en 5 minutes.

Dans les solutions à 1/5,000 et 1/10,000, elles résistent plus longtemps, mais ne se développent pas et finissent par périr.

Dans les solutions à 1/200,000 et 1/250,000, elles résistent et se développent normalement.

Il ne faudrait pas en conclure que les eaux des bassins et des baquets qui ont servi au lavage du linge ne puissent permettre le développement des stegomya dans les lavoirs. En effet, si cette eau reste au repos pendant quelques jours le taux de l'alcalinité baisse, et elle finit par ne plus pouvoir nuire à l'évolution des larves.

État parfait. — Nous avons déjà signalé l'influence que la température exerce sur l'activité du *St. fasciata* à l'état ailé; il nous reste à exposer quelques particularités de ses mœurs à ce stade.

Ce moustique, tout d'abord, est en quelque sorte un moustique domestique. Autant il abonde dans le voisinage et à l'intérieur de maisons, autant il est rare dans les endroits inhabités. Obligées de pondre sur l'eau, les femelles vont chercher le plus souvent hors de l'habitation ce milieu indispensable à leur progéniture, mais c'est à l'intérieur qu'elles se tiennent à l'ordinaire. Cela s'explique non seulement par la nécessité où elles sont de se repaître de sang et leur préférence marquée pour le sang humain, mais aussi par leur sensibilité extrême au refroissement qui les incite à chercher un abri contre l'abaissement de la température.

Les mâles se rencontrent aussi en abondance dans les maisons. Bien qu'ils paraissent obligés plus que les femelles de chercher au dehors, dans les feuillages, leur pâture, nous croyons qu'ils trouvent fréquemment à l'intérieur des habitations, sur les vêtements, les murs humides, les garde-manger et les détritus d'aliments de quoi se nourrir.

En raison de leur présence dans les locaux habités et de leur ardeur à piquer lorsque la température le leur permet, les femelles de cette espèce sont, avons-nous dit, des hôtes extrêmement fâcheux pour l'homme. Et cela à toute heure, mais principalement à partir des heures les plus chaudes de la journée et jusqu'au milieu de la nuit. C'est, suivant les cas, vers 10 ou 11 heures du

matin ou midi que les femelles commencent à manifester leur activité à satisfaire leur appétit. Par des températures approchant de 30° elles se jettent voracement sur les parties découvertes du corps, la figure et les mains, comme il est rare de le voir faire à des moustiques d'autres espèces. Une fois repues, elles ont le corps alourdi, le vol pénible, elles recherchent alors des coins obscurs où elles vont s'immobiliser pour accomplir leur digestion qui dure environ 60 heures, 3 à 4 jours se passent avant qu'elles soient reprises du désir de piquer.

Divers auteurs ont considéré le *St. fasciata* comme un moustique essentiellement diurne qui ne piquerait jamais ou presque jamais la nuit. C'est là une erreur qu'il est indispensable de détruire.

Ce moustique s'attaque à l'homme après la chute du jour, dans la nuit et le matin avant le lever du soleil; nous l'avons éprouvé personnellement. Il est extrêmement facile de s'en rendre compte si l'on examine le matin de bonne heure la moustiquaire d'un lit occupé par un malade, dans une salle où les *Stegomya* ont accès. Pour peu que cette moustiquaire ne ferme pas hermétiquement, on y trouve au matin des femelles gorgées de sang qui y ont pénétré et ont piqué pendant la nuit. Leur capture est alors très facile. C'est là un moyen que nous avons employé très fréquemment pour nous procurer des moustiques ayant piqué sur des malades atteints de fièvre jaune.

Nous nous sommes demandé si, à toutes les périodes de son existence, le *St. fasciata* femelle présentait la même aptitude à piquer indifféremment de jour ou de nuit. Si l'on considère ce moustique en captivité, on constate qu'au bout de 24 à 36 heures après la fécondation, il manifeste le maximum d'ardeur à la piqûre, que postérieurement à son premier repas de sang il continue à accepter de piquer à une heure quelconque de la journée, à condition que la digestion du repas antérieur soit complètement achevée. Toutefois il n'apporte plus de voracité à satisfaire son appétit. Il est souvent nécessaire de le maintenir longtemps au contact de la peau pour le décider à y planter son stylet. Cette paresse à piquer est surtout marquée lorsqu'il est âgé de quelques semaines. Très fréquemment on n'obtient pas alors le résultat cherché, surtout si, au lieu de maintenir le moustique au contact de la peau dans un tube de verre, on le laisse libre sous une

petite moustiquaire dans laquelle on introduit la main du sujet exposé à la piqûre.

Au contraire, si au lieu d'opérer de jour, on réalise cette expérience dans la nuit et à l'obscurité, les moustiques qui, dans le jour, s'étaient montrés paresseux à piquer le font avec empressement.

Ces observations nous ont conduits à penser que dans la nature le moustique pouvait ne pas se comporter au point de vue de la piqûre exactement comme en captivité. En vue de nous en assurer nous avons, à toute heure du jour et en un grand nombre de maisons différentes, capturé des femelles qui se préparaient à piquer. Le procédé pour opérer cette capture consistait à rester immobile dans une pièce et à emprisonner dans un tube de verre chaque moustique qui se posait sur la peau avant de lui laisser le temps d'y planter ses stylets. Nous nous sommes ainsi procuré dans le courant de deux années un nombre très considérable de *St. fasciata* femelles en condition de piquer au cours de la journée. L'examen de chacun de ces individus nous a montré tout d'abord qu'ils étaient jeunes, c'est-à-dire fraîchement sortis des pupes. En effet, tous avaient leur revêtement d'écailles en parfait état, avec les taches et les zébrures claires absolument intactes. Or lorsque dans la nature un *Stegomya* a dépassé le 15[e] jour de son existence d'insecte parfait, il est fort rare que sa parure écailleuse ne soit pas détériorée ; le dessin de lyre qui orne son thorax est presque toujours moins net, des points blancs de l'abdomen ou d'autres parties du corps ont été endommagés, et l'on reconnaît à la loupe des parties où les écailles ont plus ou moins disparu.

En second lieu nous avons constaté que ces femelles acharnées à piquer de jour avaient été accouplées, mais n'avaient jamais encore absorbé du sang. En effet toutes celles capturées dans les conditions que nous avons dites, que nous avons conservées isolées en tubes de verre en les nourrissant avec des aliments sucrés, sont demeurées indéfiniment sans pondre. Toutefois ces femelles étaient fécondées au préalable, car lorsque nous les avons fait piquer, soit aussitôt après leur capture, soit quelques jours plus tard, elles ont opéré leur ponte de 3 à 6 jours après la piqûre. La multiplicité des observations que nous avons faites sur ce sujet nous ont amené à conclure :

Que le *St. fasciata* qui pique dans la journée est l'insecte femelle jeune qui a quitté l'état de pupe depuis 2 à 4 jours seulement, qui a subi dans cet intervalle la fécondation, mais qui n'a pas encore eu l'occasion de piquer l'homme.;

Que les femelles repues de sang une première fois et libres dans les habitations cessent de poursuivre l'homme pendant la journée. Elles deviennent des moustiques nocturnes qui vivent dans les coins sombres pendant la durée du jour et ne donnent plus la chasse à l'homme qu'une fois l'obscurité venue dans la maison.

Comme pour tout ce qui concerne les mœurs et habitudes des espèces animales, nous ne prétendons pas que cette règle soit absolue au point de ne souffrir aucune exception. Mais en admettant que les insectes qui nous occupent, livrés à eux-mêmes, puissent, étant affamés ou pour une raison différente, rechercher une proie pendant la journée alors qu'ils n'en sont pas à attendre leur premier repas de sang, nous ne pensons pas que ce fait se produise lorsqu'ils ont un certain âge, lorsque, par exemple, ils ont dépassé la deuxième semaine de leur existence d'insecte parfait.

Nous avons essayé de déterminer la durée de l'existence du *St. fasciata* à l'état parfait. L'élevage de ce moustique est assez facile, il suffit de le maintenir à une température qui lui convienne dans une atmosphère humide, car il meurt rapidement placé dans l'air sec, et de l'alimenter avec des matières sucrées. En conservant des individus en captivité, on voit qu'il leur est facile d'atteindre l'âge de 2 mois. A partir du 40e jour, la mortalité devient grande, quel que soit le mode d'alimentation employé. Cette mortalité est plus grande parmi les mâles que parmi les femelles. Les individus qui ont atteint dans notre laboratoire la plus grande longévité ont vécu 89, 90, 93, 97, 105 et 106 jours. Tous ceux-ci étaient des femelles qui avaient piqué l'homme au début de leur existence et avaient été par la suite nourries avec du miel. Nous n'avons jamais pu conserver des mâles plus de 50 jours.

Nous ne croyons pas que dans la nature on puisse observer fréquemment des cas de longévité aussi considérable que ceux que nous avons cités. Le *St. fasciata* est un être fragile. Sa conservation dans la nature nécessite un assez grand nombre de con-

ditions favorables, parmi lesquelles, en premier lieu, un abri, une atmosphère humide et chaude et une alimentation appropriée. Les abaissements de température accompagnés de pluie et d'orage le font disparaître avec rapidité. Robuste et agile dans les premiers jours qui suivent sa naissance, il perd, au bout d'un certain temps, beaucoup de sa vigueur. Il est certain que lorsqu'avec l'âge, il s'est dépouillé d'une partie de ses écailles, il est beaucoup plus exposé à toutes les causes d'affaiblissement et de destruction.

Il ne nous paraît donc pas qu'à l'état libre il puisse vivre aussi longtemps qu'en captivité.

Nous n'avons envisagé, dans ce qui précède, l'influence de la température sur les fonctions du *St. fasciata* que dans les limites entre lesquelles oscille le thermomètre sous les climats de Rio de Janeiro et de Pétropolis.

L'action des températures supérieures a été étudiée au moyen de l'étuve. Nous avons constaté ainsi qu'au-dessus de 34° le développement des œufs et des larves était retardé, que l'éclosion s'opérait d'une manière irrégulière, qu'au delà de 36° la femelle effectue difficilement sa ponte et que les œufs éclosent très rarement. Enfin, si l'on maintient le moustique à une température supérieure à 39°, il ne tarde pas à mourir.

Nous avons effectué diverses expériences en vue de vérifier si le *St. fasciata* pique indifféremment l'homme à quelque race qu'il appartienne. Il en ressort que ce moustique, livré à lui-même, pique facilement le nègre et le Peau-Rouge, mais qu'il a une prédilection marquée pour la race blanche. En effet, si l'on fait piquer des moustiques neufs et de même âge par une température identique sur des individus de race noire, de race peau-rouge et de race blanche, on constate que, dans la généralité des cas, c'est sur le blanc qu'ils piquent le plus vite. Le peau rouge est aussi attaqué rapidement. Vis-à-vis du nègre, le *Stegomya* manifeste quelque répugnance; presque jamais il ne se décide à piquer immédiatement et souvent un contact de 10 à 15 minutes est nécessaire pour arriver au résultat. Parmi les individus de race blanche, le *Stegomya* manifeste également des préférences : il s'attaque beaucoup plus avidement aux individus jeunes, vigoureux, qui ont la peau fine et le teint coloré, qu'aux individus anémiés ou âgés. Ce n'est là toutefois

qu'une question de degré car, lorsqu'il est affamé, ce moustique accepte la proie qui lui est offerte.

Les faits que nous venons d'exposer concernant les mœurs du *St. fasciata* donnent le moyen de se rendre compte des conditions climatériques que doit présenter une région pour permettre l'existence et la multiplication de cette espèce. Comme on l'a vu, tout climat chaud et humide, dont la température se maintient en certaines saisons entre 25° et 35°, lui convient particulièrement. Si la température vient à s'abaisser pendant la nuit entre 22° et 25°, celle de la journée demeurant supérieure à ce chiffre, il se multiplie encore, mais plus faiblement. Lorsque l'abaissement pendant une période prolongée, de 6 à 7 mois par exemple, est tel que la température moyenne de la nuit soit inférieure à 22°, on assiste à la disparition de l'espèce. Il importe de noter que par ce chiffre de 22° il ne faut pas entendre le minimum thermométrique nocturne, qui pourra fort bien être inférieur à la température moyenne de la nuit. En effet, si le thermomètre indique des minima de 22° à une saison donnée, ces minima représentent un abaissement momentané et de courte durée, tandis que la température qui a régné pendant la plus grande partie de la nuit sera de plusieurs degrés supérieure à ce chiffre minimum. Nous insistons sur ce point, car pour que les actes fonctionnels du *St. fasciata* soient ralentis au point de compromettre sa multiplication, il ne suffit pas qu'il soit exposé pendant quelques instants à une basse température; en ce cas il éprouve un engourdissement passager après lequel, la température s'élevant, il reprend toute son activité. De plus le moment des minima nocturnes est rarement assez prolongé pour que la température intérieure de l'habitation ait le temps de s'abaisser au même chiffre. Par conséquent le *St. fasciata* réfugié à l'intérieur de cette habitation ne sera jamais soumis à une température aussi basse que celle indiquée par les chiffres minima qui figurent dans les observations météréologiques d'une région. Il faut compter aussi que l'instinct de ces moustiques les pousse à rechercher dans une habitation les endroits les plus chauds pour y passer la nuit, les chambres à coucher et les cuisines. Et ceci nous donne l'explication d'un fait qui a été signalé un grand nombre de fois, c'est qu'en temps d'épidémie de fièvre jaune, soit à terre, soit à bord des navires, les cuisi-

niers, les mécaniciens, les chauffeurs, les boulangers et toutes les personnes qui passent la soirée ou la nuit entière dans les cuisines, les boulangeries, ou les chambres de machines, sont particulièrement exposées à contracter la fièvre jaune.

Pour qu'une contrée soit inhospitalière au *St. fasciata*, il faut donc que son climat possède une saison fraîche prolongée de façon que non seulement les adultes, mais les larves aussi et les œufs soient détruits. Les adultes, lorsque la température devient inférieure à 22°, disparaissent très vite; cela tient surtout à ce qu'ils perdent vers 17° ou 18° environ la facilité de piquer et de s'alimenter. Il n'en est pas ainsi pour les larves qui, nous l'avons vu, supportent longtemps sans en souffrir beaucoup des températures de 12°. Toutefois, par des températures inférieures à 22°, ces larves n'arrivent pas à maturité, elles ne se métamorphosent pas ou très difficilement en insectes parfaits, et les insectes parfaits, nés dans ces conditions, sont ordinairement chétifs et de petite taille. Il est nécessaire que la température soit supérieure à 22° pour l'accomplissement normal de cette métamorphose. Dans le cas contraire, l'état larvaire se prolonge pendant un temps que nous n'avons pu déterminer avec précision. Nous avons fait ces expériences à Pétropolis en saison fraîche; or, des relèvements momentanés de la température qui se produisaient à des intervalles peu éloignés ont permis à nos larves de se métamorphoser au bout d'un temps variable. La plus longue durée de ce stade que nous ayons observée a été de 65 jours.

Si l'on considère que la résistance au refroidissement est encore plus grande pour les œufs que pour les larves, puisque ceux-ci peuvent, s'ils sont desséchés, passer plusieurs mois sans perdre leur vitalité et éclore une fois remis dans l'eau, on voit que si la saison fraîche n'est pas de longue durée l'espèce peut se conserver. Néanmoins, l'expérience démontre que dans la nature la résistance du *St. fasciata* est beaucoup moindre que dans le laboratoire où il est mis en observation. C'est ainsi qu'à Pétropolis on peut conserver l'espèce en captivité durant la saison fraîche, tandis que les individus mis en liberté sont incapables de faire souche.

En résumé, il résulte de nos observations qu'un climat où les températures nocturnes moyennes sont supérieures à 22° et les

températures diurnes supérieures à 25° suffit au *St. fasciata* et que ce moustique ne peut exister sous un climat où les moyennes nocturnes sont inférieures à 22° quand même les températures diurnes dépasseraient 25°.

Ces considérations sur la biologie du *St. fasciata* étaient indispensables pour étudier le mécanisme de la propagation de la fièvre jaune et fixer les règles de la prophylaxie.

V

La province de Rio-de-Janeiro est une contrée particulièrement favorable à l'étude des rapports qui existent entre le développement de la fièvre jaune et le *St. fasciata*. La plaine mamelonnée qui s'étend autour de la baie de Rio en un vaste fer à cheval d'environ 40 kilomètres de diamètre, est environnée par une ceinture de montagnes dont l'altitude varie de 400 à 600 mètres pour les chaînons isolés situés au sud, et de 1,000 à 2,000 mètres pour la grande chaîne située au nord et à l'ouest de la baie.

Rio occupe dans la plaine contre les montagnes du sud de la baie une vaste étendue, et, à des altitudes très diverses, existe un nombre considérable de faubourgs disséminés à des distances plus ou moins grandes de la capitale; les plus intéressantes pour nous de ces agglomérations sont Sainte-Thérèse et Tijuca à 200 mètres, la station de Meio da Serra à 350 mètres, Paneiras à 400 mètres, Pétropolis à 800 mètres, Fribourg et Therésopolis à 900 mètres environ[1].

Les climats varient en ces divers points selon leur altitude. Ils ont ce caractère commun que l'année est divisée en deux saisons : une saison chaude et pluvieuse qui s'étend de novembre à mai, et une saison fraîche avec des pluies peu fréquentes de mai à novembre. A Rio les minima thermométriques, pendant la saison chaude, se maintiennent entre 24° et 26°. Exceptionnellement on observe 2° à 3° au-dessus ou au-dessous. En même temps les maxima oscillent à l'ordinaire de 26° à 31°, rarement inférieurs à 25° ou supérieurs à 32°. En janvier, février,

1. La ville proprement dite se développe sur une longueur d'environ 10 kilomètres, elle est prolongée par une suite ininterrompue de faubourgs, le long du chemin de fer de Rio à Saint-Paul, jusqu'à 50 kilomètres de distance.

mars et avril, s'observent les périodes les plus chaudes, interrompues par de courtes périodes tempérées. Les fortes pluies qui, dans la saison chaude, se succèdent à Rio avec une fréquence plus ou moins grande, déterminent presque toujours un abaissement de température considérable, et le thermomètre peut occasionnellement descendre jusqu'à 18° et même 17° dans la nuit.

Durant la saison fraîche, les températures minima oscillent entre 19° et 24°. Rarement elles atteignent 26° ou 27°; rarement aussi elles sont inférieures à 18°. Pour les températures diurnes, la différence avec l'autre saison est moins marquée que pour celles de la nuit : les maxima restent entre 26° et 30°; ils peuvent atteindre jusqu'à 35° quand il y a des périodes un peu longues de sécheresse, et s'abaisser à 24° ou 23° lorsqu'il a plu.

Pendant les deux saisons l'atmosphère à Rio est humide, toutefois l'humidité est beaucoup moindre de juin à octobre que durant le reste de l'année. Il en est de même pour la région montagneuse.

Si on s'élève de 200 à 300 mètres au-dessus de la plaine de Rio, on rencontre un climat qui diffère très peu de celui de cette capitale, en ce qui concerne les températures diurnes, davantage en ce qui concerne les températures nocturnes.

Les journées à Sainte-Thérèse, à Tijuca, à Meio da-Serra sont presque aussi pénibles qu'à Rio, mais la fraîcheur des nuits est beaucoup plus accentuée. On peut estimer qu'en moyenne les températures nocturnes y sont de 2° ou 3° inférieures à celles de Rio ; vers 400 mètres, à Paneiras, par exemple, cette différence est beaucoup plus accentuée encore.

Les points plus élevés de la chaîne de montagnes où se rencontrent des agglomérations d'habitants jouissent d'un climat beaucoup plus tempéré. A Pétropolis par exemple, situé à une altitude de 800 mètres environ, la chaleur n'est jamais intense dans la journée et les nuits restent fraîches toute l'année durant Il résulte des observations météorologiques que nous y avons faites de 1901 à 1903 que les maxima aux mois les plus chauds de l'année ne dépassent 28° que tout à fait exceptionnellement. Les températures moyennes diurnes, de janvier à avril, sont approximativement de 24°. En même temps les minima varient de 14° à 20° et la température nocturne moyenne est de 20°

environ. Les pluies sont très abondantes et l'atmosphère à peu près saturée d'humidité au cours de cette période.

La saison fraîche commence généralement à la fin d'avril et se fait sentir jusqu'à novembre. Elle est peu pluvieuse. Durant six mois environ les températures maxima se maintiennent d'ordinaire entre 16° et 24°, la moyenne étant de 21°, et les températures minima entre 8° et 15°. On observe très rarement des minima de 7° et 6°.

Ces données succintes suffisent pour prévoir la distribution du *St. fasciata* dans la région : à Rio de Janeiro il existe à toute époque de l'année. Très abondant au cours de la saison chaude il se raréfie surtout pendant les mois d'août, septembre et octobre au point qu'il est quelquefois difficile de s'en procurer à certains moments de cette période. Si l'on s'élève à 200 mètres au moins, à Tijuca par exemple, on le voit apparaître tardivement à la fin de décembre ou en janvier seulement. Il y pullule jusqu'au mois de juin ou de juillet suivant que la saison fraîche s'établit plus ou moins prématurément, puis se raréfie et disparaît complètement d'août à la fin de l'année. Il en est de même à Sainte-Thérèse. Nous avons constaté dans ces localités, au mois de juillet 1902, une disparition très brusque et très générale des larves et des adultes, survenue après un abaissement de quelques degrés de la température nocturne pendant que dans la plaine, où cet abaissement avait été moins marqué, on continuait à trouver des larves en abondance.

Aux environs de 400 mètres d'altitude, on peut trouver le *St. fasciata* de janvier à mai. Mais il est nécessaire pour cela que la saison soit particulièrement chaude. C'est ainsi qu'en 1902 il nous a été impossible de récolter aucun échantillon de l'espèce à Meio da-Serra au mois de mars ; l'année suivante au contraire, nous avons observé quelques *Stegomya* vers la même époque. D'après nos renseignements les années où ils peuvent s'élever à cette altitude autour de Rio sont exceptionnelles.

Nous n'avons jamais pu rencontrer le *St. fasciata* aux environs de Rio dans des localités situées au-dessus de 400 mètres. A Pétropolis en particulier il n'existe pas. Nous l'avons établi par des observations et des recherches poursuivies d'une façon ininterrompue pendant 18 mois. Comme nous l'avons exposé,

c'est au refroidissement nocturne qu'est due l'incapacité, pour cette espèce, de vivre et de multiplier à Pétropolis hors de la captivité. On ne saurait accuser la difficulté d'accès de Pétropolis d'être la raison de son absence : journellement en effet, surtout en saison chaude, des *St. fasciata* sont amenés à Pétropolis de Rio ou des autres localités de la plaine par le chemin de fer, et maintes fois nous avons pu en capturer des exemplaires dans les wagons. Par conséquent l'importation de ce moustique à Pétropolis est un fait fréquent. D'autre part, l'altitude et la pression atmosphérique ne sont pour rien dans la difficulté qu'il éprouve à s'établir en des régions montagneuses[1]. La preuve en est qu'en diverses localités telles que Saint-Paul et Ribeiraô Preto, situées à une altitude sensiblement égale à celle de Pétropolis, le *St. fasciata* se rencontre presque régulièrement chaque année pendant les mois les plus chauds. C'est que ces localités jouissent de températures nocturnes plus élevées qu'à Pétropolis à cette époque.

Lorsque arrive la saison chaude, le *St. fasciata* se dissémine de proche en proche, autour des foyers où il subsiste toute l'année, et s'élève au fur et à mesure qu'il trouve aux diverses altitudes des températures nocturnes favorables à son tempérament. C'est ce que nous avons constaté pour Sainte-Thérèse et la Tijuca au mois de janvier; nous avons étudié également ce phénomène dans la vallée de la Piabanha, petite rivière qui s'écoule vers l'est de Pétropolis et, née à plus de 800 mètres, s'abaisse progressivement jusqu'à 200 mètres sur un parcours de 60 kilomètres environ. Cette vallée est fertile et par suite très peuplée. Dans les années ordinaires, le *St. fasciata* ne s'y rencontre pas d'une façon régulière et n'y vit que dans les parties les plus basses jusqu'à 200 ou 300 mètres d'altitude. Or pendant la saison chaude de 1902-1903, ce moustique a abondé dans la partie inférieure de cette vallée à Entrerios. De là il est remonté le long de la rivière jusqu'à Aréal, à une altitude de 400 mètres où il a pullulé à partir du mois de janvier. Au-dessus de ce point il s'est peut-être manifesté dans quelques villages, mais peu abondamment ; nous n'avons pu le découvrir dans la même

1. Il se peut qu'à des altitudes supérieures à 800 mètres le vol du *St. fasciata* soit gêné comme l'aurait expérimenté Finlay. Nous n'avons pas observé ce phénomène chez les Stegomya élevés à Pétropolis à 830 mètres d'altitude.

vallée, à Itaïpava à 600 mètres d'altitude, ni à Cascatinha, village élevé d'environ 700 mètres, assez voisin de Pétropolis.

L'année 1903 a été une année extrêmement favorable au *St. fasciata* dans les provinces de Rio-de-Janeiro et de Saint-Paul, en raison de la moindre fréquence des pluies pendant la saison chaude. L'abondance des pluies est en effet une condition défavorable à l'espèce, surtout en raison du refroidissement nocturne qui les accompagne. Aussi a-t-on pu observer le *St. fasciata* en de nombreux points où il est inconnu dans les années moyennes et à des altitudes très considérables.

Par conséquent le fait de sa non-existence à Pétropolis, que nous avons établi, n'implique pas qu'il ne puisse à un moment donné s'y multiplier. Il suffirait pour cela d'une année où les températures nocturnes se maintiendraient à quelques degrés plus haut qu'à l'ordinaire pour qu'il pût s'y acclimater. Ce que nous savons de la variabilité des saisons sous cette latitude, suivant les années, permet d'envisager cette hypothèse comme susceptible de se réaliser dans l'avenir.

Il existe une concordance remarquable entre le développement des épidémies de fièvre jaune dans la région que nous venons d'étudier et le développement du *St. fasciata*

A Rio où ce moustique subsiste toute l'année, très abondant pendant les mois chauds et plus rare en saison fraîche, la fièvre jaune sévit également toute l'année. Elle manifeste une grande rigueur pendant les mois où les *St. fasciata* abondent, et prend le caractère sporadique lorsque les *Stegomya* se raréfient. A Sainte-Thérèse et à Tijuca la fièvre jaune se manifeste à peu près chaque année, toujours à l'époque où les *Stegomya* y sont le plus communs. Comme eux, elle apparaît plus tardivement qu'à Rio-de-Janeiro et, comme eux, elle disparaît complètement pendant toute la saison d'hiver.

Dans la vallée de la Piabanha dont nous avons parlé, la fièvre jaune, qui n'avait pas fait d'apparitions depuis fort longtemps, y a suivi le *St. fasciata* en 1903. Elle a débuté à Entrerios à la fin de 1902 et, de là, s'est étendue à Aréal au mois de janvier 1903. Au-dessus d'Aréal, il ne s'est pas produit un seul cas.

Enfin, dans les localités où le *Stegomya* n'existe pas, à Thérésopolis et à Pétropolis, pour ne citer que les plus importantes, la fièvre jaune n'existe pas non plus.

Ces observations confirment d'une manière saisissante l'expérience réalisée pour la première fois à Cuba par la Commission américaine de la transmission de la fièvre jaune par le *St. fasciata*, Elles permettent en outre d'affirmer que les autres moustiques ne jouent aucun rôle dans cette transmission. Il existe à Rio un assez grand nombre d'espèces en dehors du *St. fasciata*, qui est la plus commune. Parmi celles qui peuvent être rencontrées au voisinage des habitations, nous pouvons citer : *Culex fatigans*, *Culex cingulatus*, *Culex tæniorhynchus*, *Janintosoma Lutzii*, *Psorophora ciliata*, *Anopheles argyrotarsis*. Or les périodes où l'on peut observer ces diverses espèces en quelque abondance ne coïncident nullement avec les périodes de la fièvre jaune et surtout avec la marche de l'épidémie.

C'est ainsi que le *Culex fatigans* abonde aussi bien pendant la saison fraîche que pendant la saison chaude, que le *C. cingulatus* se rencontre de préférence d'août à novembre, il nous a paru qu'il en était de même de l'*Anopheles argyrotarsis*. Le *Culex tæniorhynchus* s'est montré assez abondant au mois de février 1903; à partir de ce mois il nous a été impossible de le retrouver, bien que la fièvre jaune eût continué de sévir jusqu'en juillet. La plupart de ces espèces, moins sensibles aux différences de température que le *Stegomya*, existent dans les localités où les épidémies de fièvre jaune sont inconnues. Le *Culex fatigans* par exemple est un moustique extrêmement répandu à Pétropolis. On y trouve quelques autres espèces, mais celle-ci est la seule commune dans la ville et familière des habitations[1]. Si elle était susceptible de transmettre la fièvre jaune, cette maladie se développerait épidémiquement chaque année à Pétropolis comme à Rio.

La situation de Pétropolis au point de vue de la fièvre jaune mérite de nous arrêter. Cette ville, située à 45 kilomètres de Rio environ, à une altitude de 830 mètres, est la station où les habitants fortunés de la capitale ainsi que les étrangers qui ont à Rio leurs affaires, viennent fuir la chaleur et la fièvre jaune de décembre à juillet. Un chemin de fer reliant les deux villes permet de vaquer anx affaires à Rio pendant la journée,

1. Ce moustique est bien le *Culex fatigans* d'après M. le docteur Lutz. Toutefois, contrairement aux habitudes que les auteurs prêtent à cette espèce, il vit au voisinage et à l'intérieur des maisons à Pétropolis. La femelle recherche avidement le sang humain pendant la nuit.

et de passer les nuits à Pétropolis; il existe donc un mouvement de va-et-vient journalier très intense qui correspond exactement à la période d'épidémie de fièvre jaune à Rio. Grâce à ce mouvement la fièvre jaune a toutes les facilités de se transporter à Pétropolis. Elle y arrive assez fréquemment, mais *les cas que l'on observe à Petropolis sont tous des cas importés, la maladie ayant été contractée à Rio en général. De mémoire d'homme un cas de fièvre jaune importé à Pétropolis n'a donné naissance à un autre cas sur place. De mémoire d'homme un individu habitant Pétropolis n'a jamais contracté la fièvre jaune s'il n'est pas sorti de cette localité pour fréquenter un foyer épidémique. La cohabitation avec des malades à Pétropolis n'a jamais suffi à transmettre la maladie.*

Si la fièvre jaune perd ainsi, à Pétropolis, d'une façon absolue, son caractère contagieux, c'est à n'en pas douter parce que l'agent de transmission fait défaut.

Le *Culex fatigans* n'est donc pas cette intermédiaire. Or, il est le seul moustique de toutes les espèces de la région de Rio qui, en raison de sa persistance pendant toute l'année, de sa prédilection pour le sang humain, de sa fréquentation des habitations, pourrait-être incriminé de jouer un rôle analogue à celui du *Stegomya* dans la transmission de la fièvre jaune. S'il avait ce rôle dans les épidémies de Rio-de-Janeiro, il en serait de même à Pétropolis où, quand un cas de fièvre jaune se manifeste, toujours importé comme nous l'avons dit, aucune précaution n'est prise autour des malades, ni dans les hôtels, ni dans les domiciles privés, ni à l'hôpital, pour le mettre hors des atteintes du *Culex fatigans*. Et c'est un fait indiscutable, nous le répétons, que pas une fois un cas de fièvre jaune importé n'a fait souche à Pétropolis.

Il eût suffi de faire ici l'enquête à laquelle nous nous sommes livrés pour établir depuis longtemps que le contact du malade, la cohabitation, les excrétions, les linges souillés par les vomissements noirs ou le sang des hémorragies étaient incapables de transmettre la fièvre jaune. L'étude des cas de fièvre jaune à Pétropolis en fournit une preuve si longtemps et si souvent renouvelée, qu'elle acquiert une importance aussi décisive que les expériences faites sur ce point à la Havane par les médecins américains et par nous au Brésil, expériences qui ont consisté

à exposer des sujets sensibles à la fièvre jaune au contact prolongé des malades et des objets de literie ayant servi à ces derniers, mais en le préservant de la piqûre des *St. fasciata*.

Un autre point, d'un haut intérêt pour la prophylaxie, qui ressort de nos observations à Pétropolis, c'est que la transmission de la fièvre jaune a lieu la nuit et ne s'opère jamais, ou du moins très exceptionnellement, pendant que la soleil est sur l'horizon : parmi les habitants de Pétropolis, pour la plupart étrangers et par suite sensibles à la fièvre jaune, qui, au nombre de plusieurs centaines, se rendent quotidiennement à Rio où ils arrivent vers 9 heures du matin et qui en repartent à 4 heures du soir pour passer la nuit à Pétropolis, on n'a jamais relevé de cas certain de contagion, même quand des épidémies graves sévissent dans la capitale et quand les *St. fasciata* y abondent le plus. Au contraire. parmi ceux qui ne remontent pas régulièrement à Pétropolis chaque soir, les cas de contagion sont relativement fréquents. Il suffit d'une nuit passée à Rio pour y être exposé. La présence dans le foyer amaril après le coucher du soleil paraît donc être une condition nécessaire pour contracter la fièvre jaune. Nous avons eu connaissance d'un seul cas où un individu habitant Pétropolis aurait éprouvé la maladie sans avoir couché à Rio dans la quinzaine qui a précédé l'atteinte : ce cas ne saurait être pris en considération parce qu'il n'est pas certain que l'individu ait été réellement atteint de la fièvre jaune.

Le fait que la transmission de la fièvre jaune a lieu de nuit est en apparente contradiction avec la théorie qui attribue au *St. fasciata* le rôle de propagateur unique de cette affection. En effet, non seulement ce moustique est connu pour piquer l'homme dans la journée aussi bien que la nuit, mais encore les expériences fondamentales qui ont permis d'établir son rôle semblent démontrer qu'il le remplit aussi bien de jour que de nuit. C'est en général dans la journée que des médecins américains à Cuba, des médecins brésiliens à Saint-Paul, et nous-mêmes à Rio-de-Janeiro, avons exposé à la piqûre du *St. fasciata* des sujets auxquels cette piqûre a communiqué la fièvre jaune.

Nous avons exposé, à propos des mœurs du *St. fasciata* comment nous avons été amené à reconnaître que la femelle de

cette espèce est tourmentée de jour et de nuit par le besoin de piquer l'homme lorsqu'elle est jeune et fraîchement fécondée; qu'après avoir satisfait sa soif de sang pendant les premiers jours de son existence d'insecte parfait, elle perd son activité diurne et préfère la tranquillité et l'obscurité de la nuit pour attaquer à nouveau l'homme lorsqu'elle en éprouve la nécessité; qu'enfin, maintenue captive, elle consent en général à piquer à n'importe quelle heure du jour, pourvu qu'elle ait été soumise à un jeûne suffisamment prolongé. Comme la femelle qui a piqué un malade atteint de fièvre jaune est susceptible de transmettre la maladie seulement après un intervalle minimum de 12 jours, ainsi que l'expérience l'a démontré, on s'explique très bien, étant donné les mœurs de l'insecte, que dans la nature la transmission s'effectue ordinairement la nuit. Peut-être même cette règle est-elle absolue.

Il résulte des données fournies par l'observation et l'expérience :

1° Que la fièvre jaune ne se transmet dans la nature ni par le contact direct avec le malade, ni par le contact avec les objets à son usage, ni par ses excrétions;

2° Que la transmission s'effectue par la piqûre des moustiques et que la seule espèce dangereuse, au moins dans la région où nous avons opéré nos recherches est le *St. fasciata;*

3° Que cette transmission n'a pas lieu en plein jour pendant que le soleil est sur l'horizon.

Ces données doivent servir de base à la prophylaxie.

VI

L'agent de transmission étant connu, il est évident que la première et la plus importante des mesures prophylactiques consiste dans sa destruction.

Le *St. fasciata,* nous l'avons vu, loin d'être un hôte des bois ou des marécages comme la plupart des culicides, recherche dans les habitations à la fois un refuge contre le refroidissement nocturne, et la nourriture qu'il préfère. Cette particularité fait qu'on peut poursuivre la destruction dans un foyer de fièvre jaune plus facilement et avec plus de succès que pour aucune autre espèce peut-être. Pour réaliser cette destruc-

tion il est nécessaire d'organiser d'une manière systématique et continue la chasse aux larves et aux insectes parfaits.

C'est en s'attaquant aux larves qu'on obtient les résultats les plus importants. Cette chasse exige une grande minutie : tout ce qui, dans une maison et à son voisinage, est susceptible de constituer un dépôt d'eau stagnante, doit être l'objet d'une surveillance constante. Les bassins, les étangs, les flaques persistant après les pluies, les installations pour l'arrosage, les lavoirs, les caniveaux, les gouttières et, à l'intérieur des habitations, les récipients à eau potable ou non, les installations de bains et de douches, les réservoirs de distribution d'eau. les caisses à eau pour la chasse des cabinets d'aisance, sont autant de nids à *Stegomya* d'où il faut les déloger. En ce qui concerne les bassins, les étangs et tous les dépôts d'eau un peu considérables, l'expérience a montré que le procédé le plus efficace de destruction des larves qui y vivent consiste à répandre à leur surface une petite quantité de pétrole. Ce moyen est excellent sans doute, mais nous ne saurions assez insister sur l'avantage qu'il y a à faire disparaître du voisinage des maisons tous ceux de ces dépôts d'eau qui n'ont pas une utilité absolue. Les bassins d'agrément, qui ornent si fréquemment les cours et jardins des habitations tropicales, procurent très peu de fraîcheur et, en échange de cette avantage discutable, ont l'inconvénient non seulement de servir à l'élevage des larves de moustiques, mais encore d'attirer les adultes et d'entretenir beaucoup d'humidité sous ces climats où l'atmosphère est déjà humide à l'excès. Ils doivent disparaître de toute habitation hygiénique.

Pour les arbres et la verdure, si l'on ne peut conseiller leur suppression dans les villes des pays chauds, du moins, en raison de leur propriété d'attirer les insectes et les moustiques en particulier, ils doivent être écartés des murs de maisons.

C'est l'architecture même de l'habitation qui doit assurer la protection nécessaire contre la chaleur et les rayons du soleil. Des vérandas et une orientation rationnelle des ouvertures remplacent avec avantage les massifs de feuillage habituellement entretenus à une trop grande proximité[1]. Les bassins et tous

1. On sait par les recherches de Lutz qu'un grand nombre de végétaux dont les feuilles conservent de l'eau de pluie peuvent servir à la multiplication des moustiques.

les récipients nécessités par le lavage du linge doivent être régulièrement vidés et maintenus secs en dehors des moments où ils servent; de même pour les bassins et ustensiles d'arrosage. Ceux qu'il n'est pas possible de remplir et de vider à volonté, ainsi que les puits et les citernes, doivent être pourvus d'une porte ou couvercle à fermeture hermétique, à panneaux pleins ou garnis de toile métallique. Les gouttières des toitures retiennent très fréquemment une certaine quantité d'eau de pluie; pour en assurer le parfait écoulement, on doit leur donner une pente suffisante et maintenir constamment libres les tuyaux de descente qu'obturent facilement les détritus végétaux. Par une bonne construction et une pente rapide, on doit également empêcher toutes les collections d'eaux ménagères dans les caniveaux, les égouts d'évier et toutes les voies d'écoulement des eaux usagées. Enfin on doit supprimer les vases ornementaux qui décorent si fréquemment les façades des maisons.

A l'intérieur des maisons, les caisses à eau sont particulièrement recherchées par les *Stegomya* pour y effectuer la ponte. Le fonctionnement de ces réservoirs exigeant qu'ils aient des ouvertures pour l'entrée de l'air, il faut que ces ouvertures soient garnies de toile métallique, de manière à en fermer l'accès aux moustiques. De plus, ces ouvertures doivent être bien en vue autant que possible, afin que, si la toile métallique vient à se détériorer, par la rouille, par exemple, il soit facile de s'en apercevoir et d'y remédier. Les salles de bains, les cabinets d'aisance, les cuisines, les offices nécessitent une surveillance attentive au point de vue des eaux qui peuvent séjourner dans des récipients qu'on aurait oublié de vider.

Ces mesures concernant les larves ne sauraient, on le conçoit, avoir d'efficacité qu'appliquées simultanément sur toute l'étendue du territoire qui constitue un foyer amaril. On ne doit pas oublier, si ce territoire est au bord de la mer, que les larves de *Stegomya* peuvent se développer dans les eaux saumâtres.

La destruction des insectes parfaits présente moins de chances de succès par le fait qu'on peut les atteindre seulement de l'intérieur des habitations. Elle n'en a pas moins une grosse importance puisque c'est dans les habitations que se tiennent à l'ordinaire les femelles infectées, c'est-à-dire les moustiques immédiatement dangereux. Les gaz asphyxiants tels que l'acide sulfu-

reux, à 8 grammes par mètre cube, sont les meilleurs agents de destruction quand leur application est possible; les inconvénients qu'ils entraînent obligent le plus souvent à recourir aux fumées qui engourdissent les moustiques. Celle produite par la combustion de la poudre de pyrèthre est particulièrement à recommander. Exposés à cette fumée, les moustiques tombent à terre. Comme ils sont en général seulement engourdis et peuvent se relever et reprendre leur vol au bout de quelques heures, il est indispensable de faire suivre l'application de la fumée par un soigneux balayage du parquet et la combustion des balayures. Nous avons constaté expérimentalement que les moustiques gorgés de sang sont moins sensibles à la fumée que ceux qui sont à jeun; il est utile d'en tenir compte. Au point de vue de la quantité de pyrèthre à employer, elle varie selon qu'il s'agit ou non de pièces parfaitement closes. Dans une pièce étanche, il suffit de brûler 2 grammes de cette poudre par mètre cube; pour amener la mort des moustiques, si la pièce a des ouvertures qui ne peuvent être parfaitement obturées, on doit en employer une quantité beaucoup plus considérable.

Dans un foyer de fièvre jaune, on ne saurait se confier d'une manière exclusive à ces mesures et se borner là. La destruction des *Stegomya*, sur un territoire étendu, si parfaitement organisé que soit le service chargé de la réaliser, offre des difficultés trop grandes pour qu'on puisse l'espérer complète et absolue. Il est indispensable, par suite, de modifier l'installation des habitations de façon à les rendre inaccessibles aux moustiques. Ce but peut être atteint par l'adaptation aux fenêtres et, en général, à toutes les ouvertures, de cadres garnis soit de toile métallique, soit de toile ou tulle à moustiquaire. C'est là un procédé fort en usage en beaucoup de régions pour se préserver des moustiques et dont les résultats sont excellents. Les mailles des tissus employés ne doivent pas dépasser 1 mm. 1/2 de diamètre. Les habitudes du *Stegomya* de pénétrer dans les maisons pendant la journée obligent à appliquer ce mode de fermeture d'une façon permanente et non à partir du coucher du soleil seulement, comme on le fait en certains pays pour se protéger contre d'autres espèces. Comme complément à ces dispositions, chaque lit doit être garni d'une moustiquaire bien faite. Il suffit d'examiner les divers genres de moustiquaires en usage dans nos

colonies pour se rendre compte que le plus grand embarras qu'elles causent au moustique est non d'y entrer, mais d'en sortir. Nous entendons par une moustiquaire bien faite celle qui ne présente pas d'ouvertures latérales, dont le fond, tendu au-dessus du lit, à une hauteur d'homme au maximum, a des dimensions égales à celles du lit, dont les bords ne flottent pas autour du bois de lit, mais entourent le matelas sous lequel ils sont repliés.

Bien que ces mesures paraissent d'application très simple, on doit compter avec la difficulté de modifier les habitudes d'une population au point d'obtenir leur adoption générale et rigoureuse. Nous estimons qu'une maison fermée aux moustiques par les moyens que nous venons d'indiquer offre à ses habitants une sécurité à peu près complète contre la fièvre jaune, même en période d'épidémie. Ceux-ci, d'ailleurs, peuvent impunément vaquer à leurs occupations au dehors pendant la journée. Il ne devient imprudent de séjourner à l'extérieur de l'habitation qu'à partir de la nuit. Encore n'est-il pas absolument certain qu'un *Stegomya* infecté pique l'homme en mouvement au dehors.

Ces dispositions, qui peuvent suffire à préserver les bien portants, doivent être appliquées avec la plus grande rigueur aux malades atteints de fièvre jaune. Il s'agit en ce cas d'éviter que les moustiques puissent s'infecter en les piquant, et nous répétons que le *Stegomya* femelle, dans les premiers jours de sa vie, s'attaque à l'homme de jour et de nuit. Donc la protection du malade contre les piqûres doit s'exercer d'une manière constante à partir du début de sa maladie. C'est surtout à ce moment que son sang peut infecter le moustique. L'expérience nous a prouvé, en effet, que le microbe de la fièvre jaune existe dans le sang pendant les 3 premiers jours de la maladie. Dans nos expériences, le sang obtenu au 4e jour ne s'est pas montré virulent. On peut s'expliquer par là que les moustiques ne puissent s'infecter ni en absorbant le sang provenant des hémorrhagies des muqueuses, lesquelles se produisent d'ordinaire vers le 4e ou le 5e jour, ni en piquant des cadavres, ce qui peut s'observer.

En raison de l'importance qui s'attache à soustraire d'une manière absolue tout malade aux piqûres de moustiques en vue d'empêcher la propagation de la fièvre jaune, il nous paraît indispensable de compléter les dispositions indiquées plus haut par

une autre plus efficace encore. Elle consiste à enfermer le lit du malade dans une cage de toile métallique ou de tissu à moustiquaire, assez vaste pour qu'on puisse circuler autour de lui. On pénètre dans cette cage par un tambour muni de deux portes, qui évite, d'une manière aussi parfaite que possible, l'introduction des *St. fasciata*.

VII

Jusqu'ici nous avons envisagé les moyens à mettre en œuvre pour lutter contre la fièvre jaune dans une région où cette maladie règne. Les connaissances récemment acquises doivent évidemment entraîner des modifications aussi radicales dans les mesures prophylactiques destinées à empêcher l'introduction de la maladie dans une région indemne.

Tout d'abord ces connaissances permettent d'établir d'avance si un pays donné remplit les conditions de réceptivité pour des épidémies amariles, et s'il y a lieu, par suite, de se préoccuper d'empêcher ces épidémies. Il suffit de l'existence du *St. fasciata* dans une région pour qu'elle réalise ces conditions de réceptivité. D'autre part, si pendant une partie de l'année le climat d'une région est tel que les moyennes nocturnes de la température ne soient pas inférieures à 22°, cette région est susceptible de convenir au développement du *St. fasciata* s'il vient à y être introduit. Elle peut, par conséquent, être visitée par la fièvre jaune. C'est donc une règle que dans toute contrée possédant cette espèce de moustique, ou présentant en certaines saisons les conditions de température qui peuvent lui convenir et que nous avons précisées, on doit se tenir en garde contre l'introduction de la fièvre jaune.

En vue de l'éviter, il est nécessaire de surveiller les provenances des pays où elle sévit. Mais ce n'est plus contre les marchandises, de quelque nature qu'elles soient, que des précautions doivent être édictées. *L'introduction des marchandises ne présente à aucun moment nul danger*. C'est le moustique et l'homme seuls qui doivent être visés.

On tiendra compte, en ce qui concerne l'homme, que l'incubation de la fièvre jaune, qui dépasse rarement 5 jours, peut se prolonger en certains cas jusqu'à 10 et même 13 jours. Nous

avons établi ce fait par des observations et des expériences qui sont exposées dans un autre chapitre. En conséquence, l'homme qui, provenant d'un foyer de fièvre jaune en activité, arrive dans une région où le *St. fasciata* existe doit être tenu en suspicion pendant une durée de 13 jours à compter du moment où il a quitté le foyer. *Il est tout à fait inutile de lui infliger une quarantaine si le Stegomya n'existe pas à ce moment dans le pays, puisque la transmission ne peut avoir lieu que par cet intermédiaire.*

Un navire provenant d'un port où sévit la fièvre jaune, qui touche un pays où le *Stegomya* n'existe pas, mais où les conditions climatériques pourraient lui permettre de se développer, doit être maintenu au large jusqu'à ce qu'on se soit assuré qu'il est exempt de moustiques de cette espèce. Il doit être suspecté particulièrement d'en contenir s'il a un chargement de sucre, excellente condition pour la conservation des moustiques dans les cales. Au cas où des *Stegomya* s'y rencontrent, il ne doit lui être permis d'approcher la terre qu'après avoir opéré à bord leur destruction complète, ce qui est réalisable au moyen de l'acide sulfureux. Les passagers, avant cette opération, peuvent sans inconvénient être transbordés et débarqués. Il n'est pas utile de prendre à leur égard des mesures de désinfection ou de quarantaine du moment où le pays ne possède pas l'agent de la transmission. Si le navire est reconnu exempt de moustiques dangereux, on peut l'admettre sans crainte et sans autre précaution au déchargement soit à quai, soit dans des conditions quelconques.

Les mesures à adopter vis-à-vis des passagers d'un navire suspect qui abordent dans un pays pourvu du *St. fasciata* varient avec la durée du voyage accompli par le navire et le fait qu'il s'est ou non manifesté, pendant la traversée, des cas douteux ou certains de fièvre jaune. À cet égard, on devra considérer comme suspects d'être la fièvre jaune tous les cas de maladie fébrile, même très légers, développés pendant la traversée. On ne fera d'exception que lorsque le médecin du bord pourra, par un diagnostic très précis, dissiper toute espèce de doute sur la nature de ces affections. Nous avons effectivement constaté que des cas légers de fièvre jaune sont journellement confondus avec des embarras gastriques ou avec des accès paludéens ou avec des atteintes de grippe, par les médecins même les plus

familiarisés avec la fièvre jaune. Dans ces cas légers, le diagnostic de fièvre jaune est souvent impossible à établir.

La mise en quarantaine, dans un lazaret, des passagers provenant d'un pays ou d'un navire suspects n'offre de sécurité que si l'accès de ce lazaret est défendu aux *Stegomya* par les moyens que nous avons spécifiés à propos de la protection des habitations, des personnes saines et des malades, dans un foyer de fièvre jaune. Nous préférons à cette mesure généralement onéreuse, vexatoire et mal exécutée, celle qui consisterait à obliger les personnes en suspicion à se présenter journellement à un agent de la Santé chargé de noter matin et soir leur température et leur état général. Au premier symptôme anormal l'individu serait dirigé sur une ambulance et placé hors des atteintes des moustiques, exactement comme s'il avait d'une manière certaine la fièvre jaune. Cette mise en observation cesserait au treizième jour, à compter du moment où les personnes qui y seraient assujetties avaient quitté le navire ou le pays infesté d'amarilisme.

Nous ne saurions entrer ici dans le détail de tous les cas qui peuvent exercer la sagacité des hygiénistes. Bornons-nous à dire qu'en toute circonstance où il est appelé à défendre un pays indemne contre l'introduction de la fièvre jaune, le médecin chargé du service sanitaire doit se souvenir :

1° Que l'existence du *St. fasciata* dans le pays est la condition du développement d'une épidémie amarile ;

2° Que dans une région où elle est inconnue, cette espèce peut ou non, selon des conditions climatériques faciles à déterminer, s'y multiplier si elle y est importée;

3° Que là où cette espèce est présente, une surveillance rigoureuse doit être exercée vis-à-vis des personnes en provenance d'un lieu contaminé ;

4° Que si chez un individu mis en observation se manifeste à un moment une élévation de température, cet individu doit être immédiatement isolé non des hommes, mais des moustiques ;

5° Que les désinfections d'effets usagés, de marchandises ou de tous autres objets ne sont d'aucune nécessité.

VIII

Parasitologie du Stegomya fasciata.

Le *St. fasciata* est, parmi les culicides, un des plus susceptibles d'être infectés par des parasites variés.

Nous avons observé chez ce moustique des levures, des champignons, une grégarine, des microsporidies.

Levures et champignons. — Chez la plupart des *Stegomya* disséqués à une période un peu avancée de leur existence, le tube digestif et très souvent les sacs à air contiennent des levures. Elles abondent particulièrement chez les individus nourris avec des fruits ou des matières sucrées telles que le miel, et diffèrent ordinairement selon la nature de l'alimentation de l'insecte. Elles forment parfois, dans le grand sac à air particulièrement, des masses sphéroïdes ou de forme irrégulière qui pourraient prêter à confusion avec des stades de sporozoaires.

Divers champignons, tels que des mucor, se rencontrent à certaines périodes avec une grande fréquence, non seulement dans le tube digestif et ses annexes, mais aussi dans le cœlome. Ils peuvent envahir toutes les parties du corps du *Stegomya* et amener sa mort, ce qui ne s'observe pas pour les levures.

Nous nous bornons à signaler l'existence des parasites de cette catégorie. Il est absolument certain qu'ils n'ont aucun rapport avec l'aptitude du *St. fasciata* à transmettre la fièvre jaune; leur description détaillée ne saurait donc avoir sa place dans ce mémoire.

Grégarine. — Très fréquemment, en disséquant des *St. fasciata* adultes, on trouve leurs tubes de Malpighi bourrés de sporocystes d'une grégarine dont on ne rencontre jamais le stade mobile, ni dans le tube digestif, ni dans les autres organes et tissus de l'insecte parfait.

Notre attention a été appelée sur ce parasite d'une façon particulière, attendu que les faits connus au début de nos recherches, concernant la transmission de la fièvre jaune, faisaient prévoir que l'agent de la maladie pouvait être un sporozoaire.

Il résulte de notre étude que les sporocystes développés dans les canaux de Malpighi d'un *St. fasciata* sont répandus dans le

milieu extérieur, soit expulsés avec les fœces pendant la vie, soit par suite de la désagrégation du cadavre de l'insecte. Entraînées par l'eau, ces spores se conservent pendant une durée dont nous n'avons pu déterminer les limites, mais que nous avons constaté pouvoir dépasser un mois.

Les larves de *St. fasciata* écloses dans une eau contenant ces spores les avalent comme elles font de matières alimentaires quelconques. Chaque spore éclôt dans le tube digestif; les sporozoïtes mobiles sortis du sporocyste pénètrent dans les parois, et vont se fixer chacun dans une cellule soit du tissu du tube digestif, soit même du tissu adipeux sous-cutané de la larve.

Arrivé dans sa cellule hôte, le sporozoïte s'arrondit et subit son évolution complète à l'intérieur de cette cellule. Le terme de cette évolution est une grégarine dépourvue d'épimérite et de protomérite, en forme de poire et mesurant 15 à 30 μ tant qu'elle reste enfermée et immobile dans la cellule hôte. Si le volume du parasite ou une cause quelconque fait éclater la cellule à ce moment, la grégarine commence aussitôt à se mouvoir avec activité. On la rencontre à la phase libre soit dans le cœlome, soit dans le tube digestif. Elle mesure alors 25 à 50 μ.

C'est durant la dernière période de l'existence de la larve et surtout au début du stade de pupe du moustique que la conjugaison des parasites s'accomplit. Pendant le stade de pupe, en même temps que se constitue le tube digestif complexe de l'insecte parfait, nos grégarines mobiles passent dans ce tube digestif et pénètrent dans les canaux de Malpighi où elles s'immobilisent et commencent à sporuler. La sporulation s'effectue très rapidement; elle est en général complète au moment où, la métamorphose terminée, le stegomya ailé s'échappe de la pupe.

Il suffit de cette courte description pour montrer qu'un tel parasite ne saurait avoir aucune relation de cause à effet avec la fièvre jaune. A aucun moment d'ailleurs, le stegomya porteur de sporocystes n'est capable de rejeter ces spores par sa trompe et de les inoculer à un animal par piqûre.

Microsporidies. — Les microsporidies que nous avons rencontrées chez le *St. fasciata* offrent plus d'intérêt que le parasite que nous venons de décrire parce que, à certains stades, elles

peuvent arriver dans la trompe et, au cours d'une piqûre, passer de la trompe du stegomya dans les tissus de l'animal piqué. De plus, il est parfois difficile de se rendre compte que l'infection chez un moustique qui a piqué un malade de fièvre jaune est antérieure à la piqûre et n'a pas été déterminée par la succion du sang. Enfin, la récente publication par les médecins du « Yellow fever Institute » (*Bull.* n° 13, mars 1903), de la découverte d'un sporozoaire qui existerait régulièrement chez les *St. fasciata* infectés avec le sang des malades de fièvre jaune, et chez ceux-ci seulement, l'analogie que nous trouvons entre certains stades du parasite décrit et dessiné par eux et celui que nous avons étudié nous obligent à donner une description complète de cette myxosporidie.

Parasite du genre Nosema rencontré chez le Stegomya fasciata.

Ce parasite existe soit chez la larve, soit chez l'insecte parfait; c'est chez ce dernier surtout que nous avons eu l'occasion de l'observer fréquemment et de l'étudier. Sur 300 *St. fasciata* femelles que nous avons disséqués de janvier à juin 1902, nous l'avons rencontré 40 fois. Il est apparu en février et nous avons cessé de le rencontrer à partir de juin.

Au contraire, pendant les 6 premiers mois de l'année 1903, ce parasite s'est montré extrêmement rare. Nous l'avons observé 3 fois seulement chez l'insecte parfait, sur plus de 200 individus que nous avons disséqués et examinés.

Il est assez rare de voir ce sporozoaire chez le moustique qui en est infecté, dans les premiers jours qui suivent la métamorphose, non qu'il n'existe pas à cette période, mais parce que le plus fréquemment il existe en nombre trop faible pour attirer l'attention, à moins que l'on ne soit prévenu et qu'on le recherche avec beaucoup de soin.

Si quelques jours après la métamorphose on dissèque le moustique parasité, on observe des corpuscules semblables la plupart du temps à la spore du *Nosema lophii*. Ces corpuscules siègent en certains points du tube digestif, tantôt dans l'estomac, plus souvent dans l'œsophage au-dessous du sphincter qui le termine, ou dans les sacs aériens qui s'ouvrent immédiatement au-dessus du sphincter intestinal. Lorsque l'infection est très avancée, le parasite abonde aussi dans le cœlome, autour du tube digestif, au voisinage des tubes de Malpighi, dans les

ovaires, entre les muscles du thorax, dans le gros ganglion nerveux de la tête autour des glandes salvaires et jusque dans la trompe, soit dans la lumière du canal aspirateur, soit entre les pièces qui constituent ce canal.

Les corpuscules, que nous désignerons dorénavant sous le nom de spores, sont parfois isolés, mais le plus ordinairement on les trouve groupés en masses plus ou moins sphériques. Leur forme est généralement celle d'un rein plus ou moins allongé et plus ou moins régulier. Fréquemment une extrémité est plus effilée que l'autre, ce qui leur donne l'aspect d'une virgule; fréquemment aussi au lieu d'être nettement réniformes, ils sont ovoïdes ou sphéroïdes.

La coloration de ces spores varie: tantôt elles sont absolument incolores et se distinguent grâce à leur réfringence particulière, tantôt elles sont d'une couleur brune plus ou moins intense, pouvant aller du marron clair au marron très foncé. Nous devons décrire séparément les spores incolores et les spores brunes.

Spores incolores. — La spore incolore est un corps en général réniforme dont la longueur égale en moyenne 2 fois le diamètre transverse, et peut atteindre 3 et 4 fois ce diamètre. Les extrémités ou pôles peuvent être parfaitement semblables, néanmoins on observe souvent qu'un pôle est plus effilé que l'autre, surtout chez les spores qui atteignent une longueur un peu considérable. Cette spore est immobile et rigide, pourvue d'une membrane transparente assez épaisse dont on peut distinguer souvent le double contour. Elle est remplie par un protoplasma transparent, homogène, dans lequel on ne distingue pas de noyau à l'état frais. Tout près de l'un des pôles on observe d'ordinaire une petite aire réfringente circulaire ou ovale, à contour net qui, au premier abord, pourrait être prise pour un noyau. L'examen montre que ce point réfringent est situé non dans la profondeur, mais à la surface du corps et affecte la membrane seule. C'est, nous a-t-il paru, une ouverture ou un amincissement de la membrane. Lorsque la spore a des pôles inégaux, l'aire réfringente, ou pore, siège au voisinage du pôle le plus volumineux. Parfois on observe deux pores semblables ou de dimensions inégales placées symétriquement, chacun

au voisinage d'un pôle et sur la même face de la spore.

Ces spores se colorent avec plus ou moins de difficulté suivant la fixation employée. Traitées par le liquide de Flemming, elles prennent le colorant et la membrane se colore très fortement à la façon de la chitine ou de la cellulose. Loin de faciliter l'étude, les colorations que nous avons obtenues la rendent plus difficile, attendu qu'on ne peut distinguer à travers la membrane fortement colorée aucun détail de structure intérieure. Aussi avons-nous surtout étudié le parasite à l'état frais.

Les spores incolores mesurent 4 à 7 μ de longueur et 2 à 3 μ de largeur.

Spores brunes. — Dans les amas de spores incolores, on voit souvent des spores colorées en brun de ton chocolat ou un peu plus clair. Ces spores peuvent aussi se rencontrer isolément; enfin on voit des amas composés exclusivement de spores brunes. Leur constitution est sensiblement la même que celle des spores claires, toutefois leur forme est moins régulière. Elles peuvent affecter une forme ovoïde ou plus ou moins sphérique. La membrane d'enveloppe est en général plus épaisse que celle des spores incolores. Elle est plus ou moins transparente et peut acquérir la coloration brune qui est, au début de la formation de la spore, limitée au protoplasma. C'est en effet le contenu protoplasmique qui présente tout d'abord cette coloration et permet, avant même que la spore ait atteint son complet développement, de la distinguer des spores incolores qui l'entourent. Plus tard la membrane se colore à son tour mais non d'une façon aussi intense que le contenu, si ce n'est exceptionnellement. Elle peut aussi demeurer incolore.

Évolution du parasite. — La spore, qu'elle persiste à faire partie d'un amas ou qu'elle soit transportée en un point de l'organisme, entraînée par les liquides qui circulent dans les lacunes ou peut-être aussi par les phagocytes, de manière à se trouver isolée en ce point, ne tarde pas à subir une évolution. Cette évolution diffère entièrement pour les spores incolores et pour les spores brunes.

Évolution de la spore incolore. — L'évolution de cette spore est surtout facile à suivre dans le sac aérien : lorsqu'un moustique

est très parasité, on trouve en effet dans le grand sac à air qui est replié sous l'abdomen des parasites à tous les stades et il est possible d'établir par l'observation la succession de ces divers stades. Si nous considérons une spore réniforme incolore, isolée en un point à l'intérieur du sac aérien, par exemple, cette spore à un moment donné va s'accroître, se gonfler, devenir plus ou moins régulièrement ovoïde, ou parfois s'allonger jusqu'à atteindre deux fois et plus sa longueur primitive. En même temps l'aire réfringente s'agrandit tantôt en conservant sa forme circulaire, tantôt en affectant celle d'un ovale. Souvent il s'en forme une seconde au voisinage du pôle opposé de la spore. La membrane tout d'abord paraît conserver son épaisseur, bientôt elle devient plus pâle et plus mince. Enfin, elle disparaît par une sorte de liquéfaction et l'on se trouve en présence d'un petit corps protoplasmique, normalement sphérique, d'aspect un peu trouble, semé de fines granulations en plus ou moins grande abondance, mais jamais granuleux à la façon de certains stades d'accroissement des coccidies. Cette masse peut être homogène, mais on voit souvent apparaître à son intérieur une ou plusieurs aires réfringentes, dépourvues de granulations. Son contour est parfaitement délimité sans qu'on y distingue aucune apparence de membrane d'enveloppe.

Le plasmode ainsi constitué s'accroît dans des proportions variables et peut atteindre un volume considérable, jusqu'à 20 et 30 μ de diamètre. Très souvent il ne dépasse pas 8 à 15 μ.

Si l'on suit les différentes phases de l'accroissement du plasmode à partir du moment où la membrane a disparu, on voit que les granulations disséminées d'abord sans ordre représentent après un certain temps un réseau extrêmement délicat qui divise le parasite en un grand nombre de logettes, à peine délimitées, à l'intérieur desquelles le plasma n'est nullement granuleux. Cette apparence ne se produit pas régulièrement et l'on peut observer des plasmodes déjà volumineux qui ont, comme au début de leur accroissement, des granulations disséminées sans ordre et en médiocre abondance dans leur masse. Arrivé à un certain degré d'accroissement, le plasmode est mûr pour la sporulation; on voit alors se délimiter à son intérieur de petites portions du plasma qui bientôt acquièrent un contour précis et finalement présentent l'aspect de la spore que nous avons décrite.

Tout d'abord le corps ainsi formé semble dépourvu de membrane, puis celle-ci se manifeste; difficile à distinguer au début, elle est, au terme de l'évolution, épaissie et pourvue, dans un grand nombre de cas, de l'aire réfringente juxtapolaire.

Suivant les cas, une portion plus ou moins considérable du plasma granuleux n'est pas utilisée et reste sous forme de reliquat; d'autrefois, toute la masse est entièrement transformée en spore. Contrairement à ce qui se passe dans l'évolution d'un stade de coccidie, le reliquat n'affecte nullement une situation spéciale dans le corps sporulé; il est ou périphérique ou constitué par des portions de plasma demeurées entre les spores. Le plasmode se comporte en un mot à la façon d'un plasmode de myxosporidie, dans le cas ou il ne se résout pas entièrement en spores. Une fois la sporulation achevée, le reliquat, s'il existe, disparaît après un certain temps par un mécanisme que nous n'avons pu déterminer. Le sporoblaste se trouve alors remplacé par un amas de spores parfaitement libres et indépendantes les unes des autres, et susceptibles d'être déplacées.

Quelque soit le point où s'effectue l'évolution du plasmode, celui-ci n'est jamais entièrement libre, il est soudé au moins par une de ses faces à l'organe sur lequel ou à l'intérieur duquel il se développe. A aucun moment il n'est doué de mouvements actifs ni susceptible de se déplacer.

Nous avons dit plus haut que la forme normale du plasmode est celle d'une sphère. C'est en effet le cas ordinaire, surtout à l'état très jeune; mais en raison de sa consistance molle, ce corps se moule sur les surfaces avec lesquelles il est en contact, ce qui l'amène à représenter tantôt un ovoïde, tantôt un hémisphère, tantôt une forme différente. De plus, l'absence de membrane d'enveloppe facilite la soudure des plasmodes que le hasard a fait pousser côte à côte, comme il est très commun. En ce cas, au nombre de 2, 3 ou davantage ils se fusionnent pour constituer une masse unique volumineuse, irrégulière et bosselée. De là une nouvelle cause des grandes différences qu'on observe dans le volume des plasmodes et des amas de spores qui leur succèdent.

Après que les spores sont devenues indépendantes les unes des autres par disparition de la gangue plasmodique aux dépens de laquelle elles se sont formées, elles ne restent pas indéfini-

ment agglomérées. L'amas est tout d'abord désagrégé par les contractions des tissus, puis soit poussées par ces contractions, soit appréhendées par des cellules mobiles, soit déplacées par des courants liquides, les spores sont ensuite disséminées dans le corps de l'insecte. Cette dissémination est plus ou moins complète et dans bien des cas une grande partie de l'amas demeure à l'endroit où il s'est développé pendant que quelques spores seulement sont transportées en d'autres points où elles donneront naissance à de nouveaux foyers d'infection.

Chez un moustique jeune, il est exceptionnel de rencontrer une infection généralisée. Au contraire, si l'on dissèque les individus infectés 8 ou 15 jours après la métamorphose, le parasite peut se rencontrer à la fois dans le tube digestif, dans le cœlome et dans les organes céphaliques, thoraciques et abdominaux[1]. Pour expliquer cette généralisation de l'infection, on doit admettre ou que des spores existaient à la fois dans le cœlome et dans le tube digestif avant la métamorphose, ou que le parasite a traversé à un moment donné le tube digestif pour passer dans les autres organes. Les deux explications nous ont paru également fondées : le premier procédé ne saurait être mis en doute, car chez la pupe et chez la larve nous avons rencontré des spores et des plasmodes dans le cœlome et dans le tube digestif. Quant au passage du parasite à travers les tissus, il est possible, bien qu'à aucun moment de son évolution il n'existe de stade mobile à proprement parler. Voici, d'après nos observations quel est le mécanisme de ce passage : lorsqu'une spore commence à évoluer comme nous l'avons décrit, en un point de la surface libre du canal digestif où elle était arrêtée, le plasmode jeune peut s'insinuer entre les cellules auxquelles il était accolé et se trouve après un certain temps complètement emprisonné au-dessous de la mince tunique qui remplace une muqueuse intestinale. Si, au lieu de s'arrêter à cette première couche, il s'insinue plus avant dans l'épaisseur de la paroi, il arrive à se loger entre la couche la plus externe du tube et les couches moyennes. Fréquemment on observe des plasmodes situés ainsi. Autour d'eux la tunique externe est soulevée et constitue une mince membrane d'enveloppe. Au fur et à mesure de l'accroissement, cette tunique se distend davantage et le parasite toujours protégé

1. Nous ne l'avons jamais observé dans les canaux de Malpighi.

par elle, représente une hernie de plus en plus volumineuse. Enfin, ayant atteint le terme de son développement, il rompt son enveloppe intestinale et les spores tombent dans le cœlome. Lorsque au lieu d'une seule spore, il en existait un certain nombre qui se sont plasmodifiées au même point de la lumière intestinale, les plasmodes qui envahissent ensemble le tissu étouffent les cellules, et à un moment donné la paroi du tube digestif est altérée sur toute son épaisseur.

Certains points du canal alimentaire sont particulièrement susceptibles de favoriser ce mode de pénétration du plasmode. La portion rétrécie située en arrière du sphincter intestinal est dans ce cas, c'est le lieu d'élection pour l'envahissement des tissus. Au contraire, les plasmodes qui se développent dans les sacs aériens restent soudés à la face interne de la fine membrane qui constitue ce sac, selon que les spores y sont arrivées par le cœlome ou par la lumière intestinale; ils ne paraissent pas pouvoir la traverser probablement parce que les cellules minces et larges qui le forment sont intimement soudées entre elles et ne présentent aucun interstice permettant au plasmode d'y insinuer des prolongements. Il n'en est pas ainsi pour les grosses cellules de l'intestin antérieur, qui sont peu adhérentes entre elles et faciles à se laisser écarter.

Nous n'avons jamais vu le parasite pénétrer à l'intérieur des cellules, il est tantôt libre dans les cavités du corps, tantôt intratissulaire, jamais intra-cellulaire. Nous avons observé en particulier que lorsque l'ovaire est envahi, les plasmodes s'insinuent entre les ovules, mais ne les pénètrent pas même lorsque l'organe est envahi au point que les ovules sont comme écrasés entre les plasmodes.

Comme on l'a vu, un plasmode peut donner naissance à un très grand nombre de spores, depuis 5 ou 6 jusqu'à 50 et au delà. Chaque spore incolore issue de ce stade étant susceptible de recommencer le même cycle à la façon d'un mérozoite de coccidie, on conçoit quelle puissance de multiplication endogène possède le parasite.

Le lieu d'élection pour l'évolution des spores incolores et du plasmode paraît être le sac à air. On peut néanmoins rencontrer des plasmodes en abondance en tout autre point du corps.

Évolution de la spore brune. — Les amas qui viennent d'être

décrits comprennent, la plupart du temps, seulement des spores incolores. Chez quelques-uns cependant on peut trouver, parmi les spores incolores, des spores de coloration brune. Elles sont relativement rares dans les amas observés chez le moustique jeune; mais si l'on dissèque des stegomya infectés depuis longtemps, elles sont plus fréquentes et paraissent le devenir davantage à mesure que l'insecte vieillit. On peut à certains moments rencontrer des amas exclusivement composés de ces spores brunes.

Le sort de celles-ci est fort différent de celui des spores incolores dont elles tirent leur origine. Comme elles et par les mêmes moyens, elles sont disséminées dans le corps de l'hôte; comme elles également, elles peuvent évoluer dans le tube digestif et les autres organes du *St. fasciata.* Mais leur évolution n'est plus du tout comparable. Tandis que celle de la spore incolore rappelle d'assez près la schizogonie des coccidies, les stades qui dérivent de la spore brune s'éloignent de tous les stades connus jusqu'ici chez les sporozoaires, pour se rapprocher du développement de végétaux inférieurs pourvus d'un mycélium.

Le premier phénomène de cette évolution est le gonflement et la déformation de la spore qui devient un sphéroïde plus ou moins régulier. La membrane s'épaissit généralement en même temps que de petites zones claires se dessinent à l'intérieur du plasma. Celui-ci devient plus foncé, puis se condense à l'un des pôles de manière à laisser vide et transparente la partie opposée de la spore. Bientôt le pôle vers lequel s'est massé le plasma émet un bourgeon. C'est ce plasma qui a traversé la coque et qui s'allonge en un filament par un phénomène tout à fait analogue à celui qui se produit pour la germination d'une spore de moisissure.

L'accroissement continue et un peu plus tard on voit à la base du filament un petit renflement qui représente la petite masse protoplasmique de laquelle il est issu et qui se trouvait primitivement incluse dans la spore. A côté de ce renflement subsiste souvent la coque vide qu'il a abandonnée. Cette coque, à ce qu'il nous a paru, ne persiste pas toujours à la base du filament. Nous croyons que lorsqu'elle disparaît c'est parce que sa substance a été utilisée pour l'accroissement de ce stade qu'on peut désigner sous le nom de stade mycélien.

Le filament progresse et s'allonge pendant un certain temps. Il peut atteindre une assez grande longueur, d'ailleurs fort variable et mesurer de 50 à 100 μ, quelquefois plus. Presque jamais il ne pousse en ligne droite, mais s'infléchit, se coude ou s'entortille en s'enchevêtrant avec ceux poussés à son voisinage. Sa forme est extrêmement irrégulière, tantôt il conserve sur toute sa longueur le même diamètre qui peut être égal ou inférieur au diamètre de la spore d'où il sort; tantôt il peut se renfler sur une certaine étendue pour s'effiler ensuite et parfois se renfle de nouveau. Ordinairement il est simple, mais on peut le voir se ramifier; il émet alors une, rarement deux branches qui ne fournisssent pas de ramifications secondaires. Toujours il affecte un aspect capricieux, tourmenté, noueux, qui rappelle de fort près celui de certaines racines d'arbres. Sa coloration est semblable à celle de la spore qui lui a donné naissance, brun allant de la teinte simplement ambrée au marron le plus foncé. Cette coloration ne présente aucune homogénéité chez un même individu, certaines parties sont foncées, d'autres plus claires sans aucune règle.

La constitution du parasite au stade filamenteux paraît se rapprocher beaucoup de celle de la spore brune, c'est une gaine rigide renfermant un filament axile de protoplasma plus foncé que la gaine.

Pendant la première période du développement, le filament protoplasmique semble assez homogène, mais plus tard il se manifeste en divers points des condensations de sa substance qui forment de petits renflements d'un brun plus foncé; autour de ces nœuds, la gaine est également renflée. Lorsque les nœuds se sont multipliés, le parasite apparaît transformé en un chapelet dont les grains sont irrégulièrement répartis sur la longueur et de grosseur très souvent inégale. Au degré le plus avancé les grains sont séparés par des espaces clairs où la gaine paraît vide de protoplasma.

Le développement du stade filamenteux semble s'arrêter là, au moins dans le corps de l'hôte. Il ne nous a pas été possible de le suivre plus loin Quant à son interprétation, nous ne pouvons jusqu'ici qu'émettre des hypothèses. La plus vraisemblable à notre avis est qu'il s'agit d'un stade de dégénérescence de la spore incolore sous l'influence de sécrétions des tissus aux

dépens desquels se développe le plasmode. Ce serait un phénomène comparable, quoique plus complexe, à la formation des spores noires du parasite de la malaria, dans l'estomac de l'anophelès. Nous pensons qu'on doit écarter l'hypothèse d'un stade de résistance inconnu chez les autres microsporidies et que la spore qui assure la conservation de l'espèce dans le milieu extérieur est la spore incolore qui produit également la multiplication endogène.

Tandis que le stade plasmodien affectionne plus particulièrement les sacs à air qui, au nombre de trois viennent s'aboucher avec le tube digestif au-dessus du sphincter intestinal, le stade filamenteux se rencontre d'une façon régulière et presque exclusive au niveau de l'intestin antérieur, au-dessous du même sphincter. Il est rare qu'on le rencontre au voisinage de l'intestin moyen ou dans d'autres régions du corps, nous ne l'avons jamais observé dans les sacs à air. Par contre, au lieu d'élection que nous venons d'indiquer, l'évolution des spores brunes s'effectue avec une remarquable intensité. Il semble aussi que les plasmodes nés en ce point de spores incolores aient une tendance prononcée à fournir exclusivement des spores brunes qui évoluent sur place. Le tissu de cette portion du tube digestif est alors envahi dans toute son épaisseur par cette végétation parasitaire qui, en outre, tapisse les parois à l'intérieur et à l'extérieur. Les filaments s'enchevêtrent les uns avec les autres d'une manière inextricable au point de constituer un véritable feutrage. Sous l'influence de l'irritation produite par le parasite le tissu envahi s'hypertrophie; il se fait une multiplication énergique des cellules de la paroi intestinale et de véritables tumeurs se forment, constituées en partie par les parasites, en parti par l'épaississement du tissu atteint. Ces tumeurs ont une teinte brunâtre; en outre des filaments parasitaires elles contiennent des spores et des débris de spores. De plus, on y voit en quantité plus ou moins grande de petits grains bruns, de grosseur inégale, disséminés sans ordre. Nous présumons que ces corpuscules proviennent de filaments mycéliens dont la gaine s'est désagrégée.

Nous avons décrit l'évolution des spores incolores et des spores brunes comme obéissant à des règles parfaitement fixes. Nous n'avons pas la certitude toutefois que la spore incolore soit, dans tous les cas et d'une manière absolue destinée à former

un plasmode. Certaines observations nous font supposer qu'elle pourrait parfois se transformer en spore brune et fournir un stade filamenteux. Les faits observés ne sont pas assez précis pour qu'on puisse l'affirmer.

La présence de spores brunes dans les amas de spores incolores à la période où les unes et les autres commencent à peine à dégager leur contour dans le plasmode, la coexistence des stades mycéliens et des stades plasmodiens chez les *stegomya* infectées, toutes les fois qu'on les dissèque à une période un peu avancée de leur existence, ne nous permettent aucun doute concernant leur parenté; les faits montrent bien qu'il s'agit d'un seul et même parasite.

Parasite chez la larve. — Chez la larve, nous avons observé seulement le stade plasmodien et les spores incolores. Bien que nous avons disséqué beaucoup moins de larves que d'insectes adultes et rencontré peu fréquemment des larves parasitées, nous admettons que le stade filamenteux ne doit pas se produire à cette phase de l'existence du moustique.

Le parasite se voit chez la larve soit dans le tube digestif, soit dans le cœlome et les tissus de la partie postérieure du corps soit dans les papilles anales.

Nous n'avons pas pu suivre aussi complètement l'évolution d'une spore dans le tube digestif des larves que dans celui des insectes parfaits, nous l'avons observé d'une façon plus complète dans les ampoules ou papilles qui, au nombre de 4, entourent l'anus de la larve. C'est évidemment du tube digestif que le parasite passe dans ces papilles qui communiquent avec le rectum. C'est aussi du tube digestif qu'il doit pénétrer dans le cœlome, sans doute par le mécanisme que nous avons indiqué pour lui permettre de traverser l'œsophage chez un insecte adulte.

Quoi qu'il en soit, le développement du plasmode et la multiplication des spores ne paraît nullement différer qu'on l'observe chez le moustique adulte ou à l'état larvaire, si ce n'est que le stade mycélien ne se produit pas dans les tissus de la larve.

De ce qui précède on peut déduire qu'il existe dans le milieu extérieur une forme de résistance représentée par les spores incolores peut être modifiées en vue de leur conservation, que

cette forme de résistance absorbée par une larve de moustique se développe dans le tube digestif et y produit des stades de multiplication endogène qui sont les plasmodes, que ces plasmodes peuvent envahir la profondeur des tissus avant la métamorphose de l'insecte, qu'après cette métamorphose le parasite continue à multiplier activement, qu'il produit en certains points du corps des stades spéciaux, les stades filamenteux, qui sont probablement des formes dégénérées du parasite; que dans la plupart des tissus il produit des spores de multiplication endogène qui sont capables, modifiées ou non, de constituer la forme de résistance dans le milieu extérieur.

Nous avons décrit la forme la plus commune de Nosema que nous avons rencontrée.

Cette forme n'est pas la seule de ce genre qui parasite le *St. fasciata*. Très fréquemment en effet on observe chez lui des corps sporulés dont les spores sont piriformes et non réniformes. Elles sont de dimension sensiblement égale à celle des dernières tantôt brunes, tantôt incolores et évoluent de la même manière à tous les stades. A en juger par le développement entièrement parallèle des deux formes de spores et en considérant que les deux formes peuvent coexister chez un même hôte, on pourrait penser qu'il s'agit d'un seul et même parasite. Néanmoins, comme la coexistence des spores piriformes et réniforme, chez un même individu, n'est pas un fait commun, comme d'autre part chaque corps sporulé ne contient jamais que des spores d'une même forme, nous estimons qu'il s'agit bien de deux variétés ou espèces de parasites et non d'une seule.

Ces deux parasites n'ont aucune relation de cause à effet avec la fièvre jaune. Pendant l'année 1902, nous avons rencontré fréquemment, parmi les *St. fasciata* que nous avions infectés en leur faisant piquer des jauneux, des individus porteurs des plasmodes et des spores de *Nosema*. Pour nous assurer que dans ces cas le parasite ne provenait pas du sang du malade, nous avons fait l'expérience suivante :

A une période où les stegomya de provenances diverses se montraient assez fréquemment parasités par des *Nosema*, nous avons recueilli un lot de larves rencontrées dans un récipient laissé en plein air sous une gouttière et contenant de l'eau écoulée de la toiture lors d'une pluie récente. Ces larves nous

ont fourni 14 femelles que nous avons isolées et que nous désignerons par la lettre A. D'autre part, ayant remarqué que les œufs pondus dans notre laboratoire donnaient naissance à des moustiques qui n'étaient jamais parasités, nous avons mis à part un lot de 6 femelles, que nous appellerons femelles B, nées d'œufs pondus dans notre laboratoire et dont les larves avaient été élevées dans un bocal à l'abri des poussières. Ces femelles B avaient subi la métamorphose à peu près en même temps que les femelles A.

Nous avons fait piquer un malade au 2e jour de maladie par les 6 femelles B et par 6 des femelles A. Les 8 moustiques A restant ont été gardés comme témoins sans piquer.

Six jours après, nous avons commencé la dissection de tous ces *stegomya*. Les dissections et les examens microscopiques ont été terminés au bout de 7 jours. Le résultat a été le suivant :

Sur 5 *stegomya* f. A ayant piqué (le 6e individu est mort spontanément et n'a pu être examiné), 2 avaient le parasite et 3 étaient indemnes ;

Sur 8 *stegomya* f. A n'ayant pas piqué, 2 avaient le parasite ;

Sur 6 *stegomya* f. B ayant piqué, aucun n'était parasité.

Postérieurement à cette expérience, nous avons observé nombre de *stegomya* parasités qui n'avaient jamais piqué de malades et qui avaient été nourris soit avec du miel, soit par piqûre sur des individus bien portants.

Parker, Beyer et Pothier ont observé dans l'estomac du *stegomya* infecté des corpuscules dont ils donnent une figure (*Bullet.* n° 13 mars 1903, fig. 15). Ces corpuscules fusiformes, considérés par eux comme des sporozoaires, ressemblent étonnamment à des levures qui se développent en abondance chez le *stegomya* nourri de bananes ou de miel. Ils admettent que ces corps se conjuguent et passent dans le sac à air où ils les retrouvent sous forme de *zygotes*. « Le zygote, disent-ils, a plus ou moins l'apparence d'une masse albuminoïde, mais sa nature exacte et son origine demeurent encore inexpliquées. Dans cette masse, plus particulièrement à la périphérie, on observe les stades du développement du parasite. Au dernier stade il est augmenté de volume; son noyau a subi la fragmentation (fig. 16). Les granules chromatiques qui résultent de cette division s'accroissent

ensuite rapidement, deviennent bien définis et forment des corps plus ou moins régulièrement ovales allongés, les sporoblastes. »

Cette partie de la description du parasite, appelé par ces auteurs *Myxococcidium Stegomyæ*, et les figures 20, 21, 23 et 24 qui s'y rapportent nous permettent de croire que Parker, Beyer et Pothier ont eu sous les yeux, dans les coupes du sac à air de stegomya, les plasmodes de *Nosema* que nous avons décrits plus haut. Leurs figures 25 et 26 manifestent également une grande analogie avec les amas de spores de cette pébrine.

L'identification de ces deux parasites, si elle arrive à être établie d'une façon précise, ôtera à nos collègues américains l'illusion qu'ils ont eu affaire à l'agent de la fièvre jaune. Cette opinion, qu'ils émettent d'ailleurs sous toutes réserves, nous surprend d'autant moins que nous avons été tentés de commettre la même erreur les premières fois que nous avons observé ce sporozoaire.

Des expériences nombreuses ont été nécessaires pour nous convaincre que les insectes parasités n'avaient pas puisé dans le sang des malades piqués par eux le germe du parasite.

Pendant que nous nous rendions à Rio-de-Janeiro, a paru, dans le *Bulletin médical* n° 81, 12 octobre 1901, un excellent travail de *M. Hilario de Gouvea*, sur « Les moustiques et la Fièvre jaune ». Cette étude sur l'épidémiologie amarilique, dans la capitale du Brésil, nous a rendu de grands services. Aussi tenons-nous à la signaler tout particulièrement.

CONCLUSIONS

1° Le sérum d'un malade au 3ᵉ jour de la maladie est virulent;

2° Au 4ᵉ jour de la maladie, le sang de l'amarilique ne contient plus de virus, même quand la fièvre est élevée;

3° 1/10 de c.c. de sérum virulent injecté sous la peau suffit à donner la fièvre jaune;

4° Le virus de la fièvre jaune déposé sur une écorchure de la peau, faite en enlevant l'épiderme, ne donne pas la maladie;

5° Dans le sérum de malade, le virus de la fièvre jaune traverse la bougie Chamberland F sans dilution;

6° Dans les mêmes conditions, il ne paraît pas traverser la bougie B;

7° Le sérum virulent, conservé à l'air à une température de 24-30°, est inactif au bout de 48 heures;

8° Dans le sang défibriné gardé sous huile de vaseline à une température de 24-30°, le microbe de la fièvre jaune est encore vivant au bout de 5 jours;

9° Au bout de 8 jours, le sang défibriné maintenu dans les mêmes conditions ne renferme plus de virus actif;

10° Le sérum virulent devient inoffensif après un chauffage de 5' à 55°;

11° Une injection préventive de sérum chauffé 5' à 55°, donne une immunité relative qui, suivie de l'inoculation d'une très petite quantité de virus, peut devenir complète;

12° L'injection de sang défibriné, conservé au laboratoire sous huile de vaseline pendant 8 jours au moins, donne une immunité relative;

13° Le sérum de convalescent est doué de propriétés nettement préventives;

14° L'immunité conférée par le sérum de convalescent est encore appréciable au bout de 26 jours;

15° Le sérum de convalescent paraît jouir de propriétés thérapeutiques;

16° Ainsi que l'ont prouvé Reed, Carroll et Agramonte, la fièvre jaune est produite par la piqûre du *Stegomya fasciata*;

17° Pour pouvoir déterminer la maladie chez l'homme, ce moustique doit s'être infecté, au préalable, en absorbant du sang d'un malade atteint de fièvre jaune pendant les 3 premiers jours de la maladie;

18° Le moustique infecté n'est dangereux qu'après un intervalle d'au moins 12 jours écoulés depuis qu'il a ingéré du sang virulent;

19° La piqûre de deux moustiques infectés peut donner une maladie grave;

20° Le moustique paraît d'autant plus dangereux qu'il pique plus tard après le moment où il s'est infecté;

21° La piqûre de moustiques infectés ne donne pas fatalement la fièvre jaune;

22° Quand elle est restée sans effet la piqûre de moustiques infectés ne donne pas l'immunité contre une injection virulente ;

23° Dans la région de Rio-de-Janeiro comme à Cuba aucun autre culicide que le *Stegomya fasciata* ne concourt à la transmission de la fièvre jaune ;

24° Le contact avec un malade, ses effets ou ses excrétions est incapable de produire la fièvre jaune ;

25° En dehors de la piqûre du *Stegomya* infecté, le seul moyen connu de déterminer la maladie, est l'injection, dans les tissus d'un individu sensible de sang provenant d'un malade et recueilli pendant les 3 premiers jours de la maladie ;

26° La fièvre jaune ne peut affecter un caractère contagieux que dans les régions qui possèdent le *Stegomya fasciata;*

27° La prophylaxie de la fièvre jaune repose tout entière sur les mesures à prendre pour empêcher le *Stegomya fasciata* de piquer l'homme malade et l'homme sain ;

28° Il faut tenir compte de ce fait que la période d'incubation de la fièvre jaune peut se prolonger jusqu'à 13 jours ;

29° Le *Stegomya fasciata* est fréquemment parasité par des champignons, par des levures et par des sporozoaires. Aucun des parasites de ce genre rencontrés jusqu'ici n'a de rapport avec la fièvre jaune ;

30° Pas plus dans le moustique que dans le sang, nous n'avons réussi jusqu'à présent à mettre en évidence l'agent de la fièvre jaune.

EXPLICATION DES FIGURES

(Planche XV.)

Fig. 1. — Spore réniforme incolore de *Nosema Stegomyæ* ;

Fig. 2. — Spore réniforme brune ;

Fig. 3. — Spore piriforme incolore ;

Fig. 4. — Spore piriforme brune ;

Fig. 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12. — Divers stades de l'évolution de la spore incolore pour constituer un plasmode ;

Fig. 13. — Plasmode dans lequel commencent à se former des spores ;

Fig. 14. — Plasmode sporulé, les spores encore jeunes ne sont pas pourvues de la petite aire réfringente qu'elles présentent à maturité;

Fig. 15. — Amas de spores mûres dans un sac à air;

Fig. 16. — Plasmode sporulé sur la paroi cœlomique de l'intestin faisant hernie dans le cœlome;

Fig. 17. — Plasmode, amas de spores et spores libres dans une papille anale de la larve de *Stegomya fasciata;*

Fig. 18. — Spores réniformes brunes au moment de développer leur filament;

Fig. 19, 20. — Apparition des filaments;

Fig. 21. — Filament ramifié provenant d'une spore brune;

Fig. 22. — Filament moniliforme provenant d'une spore brune;

Fig. 23, 24, 25. — Développement du filament chez la spore piriforme brune;

Fig. 26. — Plasmode contenant des spores brunes et des filaments, développé sur la paroi cœlomique de l'intestin;

Fig. 27. — Levures communes dans le tube digestif du *Stegomya fasciata* nourri de fruits.

Fig. 28. — Coupe semi-schématique sagittale d'un *Stegomya fasciata.*

A. — Muscle du labrum. — B′, B′, B″, B″, B‴, muscles du pharynx. — C. — Muscle du labium. — D. Muscle du réceptacle salivaire. — E. — Muscle sagittal du thorax.

F. F′. — Ganglion céphalique. — F′. Prolongement nerveux du ganglion céphalique dans le labium. — G. Ganglion thoracique. — G′. Bandelette thoraco-céphalique.

H. — Pharynx ascendants. — H′ Pharynx horizontal. — I. — Œsophage. — J. — Intestin antérieur. — J′ Intestin moyen. — J″ Intestin postérieur. — K K′ Rectum.

L. — Glande salivaire. — L′ Conduit salivaire. — L″ Receptacle salivaire.

M. — Sac à air.

N. — Canaux de Malpighi.

O. — Ovaire. — P. Oviducte. — Q. Receptacle seminal.

R. — Plasmode de *nosema* qui se sont développés dans l'épaisseur du ganglion nerveux abdominal, étouffant toutes les cellules nerveuses.

R. — Plasmode de *nosema*, développé sur la paroi du sac à air. — R′. Plasmode de *nosema* développé sur le paroi œsophagienne.

S. — Levures répandues dans le sac à air.

T. — Pseudo-navicelles de grégarine.

U. — Tissu conjonctif.

Fig. 23. — Coupe de la figure 28, suivant la portion *a b*. Pour l'explication se rapporter aux indications de la figure précédente.

ÉTUDES SUR LA CLAVELÉE

Sérothérapie et séroclavelisation.

PAR A. BORREL.

En France, dans le Nord, l'Est, l'Ouest, le Plateau central, la clavelée est une maladie relativement rare : des foyers épidémiques limités sont signalés tous les ans, mais dans ces régions la maladie est toujours importée et ne s'installe pas, les épidémies dues presque toujours à l'introduction de moutons algériens sont facilement combattues sur place et ne s'étendent jamais beaucoup : le cantonnement des troupeaux atteints est une mesure très efficace lorsque la déclaration est faite à temps au service sanitaire et la clavelée a rarement fait de grands ravages, bien que la mortalité sur les troupeaux infectés soit considérable et atteigne quelquefois 50 à 60 0/0 de l'effectif.

Il en est tout autrement dans le midi de la France, dans les Bouches-du-Rhône, le Var, les Basses-Alpes, etc. : la clavelée existe là de temps immémorial. Elle est endémique d'ailleurs dans toute la région méditéranéenne : Espagne, Italie, Tunisie, Algérie. En France, dans la Crau et la Camargue, elle est régulièrement entretenue tous les ans par les arrivages de moutons algériens, qui viennent passer l'été sur la terre française, et remplacer les moutons indigènes partis dans les Alpes en transhumance, à la recherche d'un climat moins torride et d'une nourriture qui leur suffise.

Dans ces régions l'élevage du mouton se fait en grand; il y a plus de 300,000 moutons sur le territoire de la commune d'Arles; les troupeaux de 3,000, 4,000 bêtes ne sont pas rares.

Le fond du troupeau est constitué par des brebis gardées pour la reproduction jusqu'à l'âge de sept et huit ans; les agneaux sont vendus chaque année aux foires du printemps.

En octobre, novembre, décembre, naissent les agneaux : ceux-ci sont élevés jusqu'à l'âge de 4 et 5 mois, puis ils subissent des sorts variés; un certain nombre de femelles sont

conservées pour remplacer chaque année les vieilles brebis dont les dents ont fini par s'user à tondre l'herbe rare et succulente qui pousse sous les cailloux de la Crau. Les agneaux mâles sont châtrés pour la plupart et vendus aux grandes foires du 3 mai et du 20 mai à Arles ; les bergers des départements voisins viennent s'y approvisionner, renouveler leurs troupeaux, acheter les agneaux qu'ils vendront plus tard sur les marchés des grandes villes, Lyon, Marseille ou Paris.

Un certain nombre d'agneaux mâles sont triés chaque année et gardés comme béliers.

Au mois de juin, les béliers reproducteurs sont mis en contact avec les brebis et le troupeau part en montagne : l'herbe manque en Crau ou en Camargue pour les métis arlésiens. La transhumance se fait surtout par voie ferrée ; il est rare maintenant de voir le long des routes poussiéreuses le pittoresque défilé des troupeaux d'autrefois.

Certains propriétaires, plus favorisés au point de vue des herbages, estivent, leur troupeau passe tout l'été dans le midi ; ils « font » des agneaux toute l'année, utilisent le lait des brebis pour la fabrication des fromages, et vendent aux mois de juillet, août, de jeunes agneaux aux bouchers de la région.

Été comme hiver, la clavelée sévit toujours et partout dans la Camargue et la Crau. La diffusion de la maladie est due surtout à ce que les bergeries, laissées vides au mois de juin par la transhumance, se garnissent de moutons algériens qui savent trouver de quoi manger, et engraissent là où les moutons indigènes mouraient de faim.

Ceux-ci redescendent des Alpes au mois d'octobre et remplacent, dans les bergeries, les algériens qui sont livrés à la consommation; ils y trouvent presque toujours le germe récent de la clavelée algérienne.

La clavelée est le constant souci du berger. Depuis la disparition du charbon, grâce aux vaccinations pastoriennes, il est bien certain que la clavelée est la maladie qui occasionne le plus de pertes et d'ennuis aux éleveurs de la race ovine.

Entre la clavelée et le berger, la lutte est de tous les instants. Au prix de grands efforts, le berger arrive quelquefois à couper la maladie, en « levant » tous les jours les bêtes malades et qui montrent les premiers débuts de l'éruption, mais souvent ce n'est

que partie remise; une « lunée », deux « lunées » passent, la maladie n'a pas lâché prise et la lutte doit recommencer; on en cite qui ont lutté plus d'une année: tous les jours, tous les deux jours, il faut « tomber » les brebis pour les examiner minutieusement, et malheur au propriétaire dont le berger laissera passer une bête malade, une éruption méconnue, des pustules trop discrètes, un chancre d'inoculation non diagnostiqué; la source d'infection restera et le troupeau tout entier prendra la maladie.

Il serait donc très important et très avantageux, pour les éleveurs du midi de la France, d'avoir une méthode de vaccination qui les mette à l'abri de surprises trop désagréables, qui leur permette de se livrer à la culture du mouton sans avoir à redouter la clavelée, sans être exposés à manquer lenrs marchés, ou à supporter, de par la loi sanitaire, de grandes responsabilités, ou à rester cantonnés sur place dans des moments où la nourriture mànque, et lors que la transhumance s'impose.

On a essayé de lutter par des lois sanitaires: on a exigé, pour la transhumance, des certificats de vétérinaires autorisant le transport des seuls animaux sains; mais que de difficultés dans la pratique, que de moyens de tourner la loi et de laisser le danger passer!

L'expérience est faite : la clavelée sévit toujours plus fort; le seul remède est évidemment dans la vaccination du troupeau total, faite une fois pour toutes, dans la vaccination des *nourries* annuelles, devenue obligatoire chaque année de telle date à telle date, et le cantonnement pendant les périodes de clavelisation.

Cette vaccination est possible, elle peut être rendue peu dangereuse par l'emploi adjuvant du sérum anticlaveleux, et les dangers de dissémination seront réduits au minimum lorsque chaque propriétaire, d'ici deux ou trois ans, aura été vacciné chez lui. Un cantonnement efficace se fera de lui-même par la police réciproque des bergers. Inutile de vacciner les troupeaux non encore atteints; il vaudra beaucoup mieux attendre l'éclosion de la clavelée dans le troupeau, et vacciner à ce moment, suivre pas à pas la maladie et éteindre ainsi chaque nouveau foyer; le troupeau principal étant vacciné, chaque propriétaire, à partir de ce moment, fera vacciner chaque année les agneaux nouveau-nés.

Pour l'Algérie, la question de la clavelée se présente sous un tout autre jour; on peut dire que tous les moutons algériens ont été, sont ou seront claveleux; mais chez eux, la maladie passe généralement inaperçue, quelques rares boutons rapidement flétris apparaissent sur le museau, aux aines, aux aisselles; l'animal ne cesse pas de manger, les pertes sont insignifiantes sur les animaux adultes; les agneaux jeunes seuls sont beaucoup plus sensibles.

Malheureusement ce virus claveleux, si peu offensif pour les moutons algériens, infecte le troupeau français, beaucoup plus sensible, et cause des pertes énormes lorsqu'il est porté en France. Le début des épidémies en France est toujours marqué par l'introduction de moutons algériens; j'ai pu moi-même souvent vérifier le fait, à Caudry (Nord), à Honnécourt (Pas-de-Calais), à Ardes (Puy-de-Dôme), etc., etc. Il est bien certain aussi que la clavelée est surtout entretenue dans le midi de la France par les arrivages annuels des moutons africains.

Des mesures de protection ont dû forcément être prises vis-à-vis des moutons algériens et Nocard a fait accepter l'idée de la clavelisation totale du troupeau algérien : ne doivent entrer en France que des moutons algériens préalablement clavelisés et dûment guéris.

Le projet de Nocard est actuellement en voie d'exécution, et je montrerai dans le cours de ce mémoire qu'il est de réalisation facile, qu'il doit être peu onéreux, et sera chose faite lorsque les importateurs de moutons algériens comprendront leur véritable intérêt.

Marche de la maladie dans un troupeau infecté.

La clavelée ou variole ovine est une maladie du mouton qui ressemble beaucoup à la variole humaine : elle est caractérisée par le développement de pustules sur toute la surface cutanée.

L'observation la plus vulgaire a montré de tout temps que l'épidémie claveleuse dans un troupeau va par poussées successives, à des intervalles presque réguliers connus sous le nom de « lunées ». Ces périodes sont réglées non pas par la lune, mais par l'évolution même de la maladie, depuis le moment où l'animal s'infecte jusqu'au moment où il devient surtout dangereux pour ses voisins, c'est-à-dire aux stades de sécrétion et de

desquamation des pustules d'inoculation ou de généralisation; cet intervalle est de 20 à 25 jours.

Quand un animal devient claveleux, il a toujours, au point où se fait l'infection première, une réaction locale considérable, un vrai chancre d'inoculation. Cette lésion peut être visible et située sur le tégument externe, ou passer inaperçue parce qu'elle intéresse les premières voies digestives ou respiratoires.

Souvent la maladie débute par une très grosse pustule sur une patte, sur le flanc, sur le museau, qui signale la porte d'entrée du virus; l'animal s'est clavelisé lui-même : le virus répandu sur le sol, sur les mangeoires, sur une claie, contre le mur, a pénétré par quelque excoriation; il y a une véritable inoculation qui donne lieu au développement de la pustule, puis d'une plaie chancreuse recouverte d'une croûte noirâtre d'aspect gangréneuse; il est rare que les animaux porteurs de pareilles pustules meurent, la maladie est presque toujours bénigne, les pustules de généralisation sont rares et discrètes.

Mais ordinairement, le mode d'infection est tout autre, le chancre d'inoculation n'est pas visible, la lésion est profonde, due à l'ingestion de fourrages virulents ou à l'absorption de poussières claveleuses; les premiers débuts de la maladie sont marqués par un abattement de l'animal qui ne mange plus, suit difficilement le troupeau; la température est élevée, le museau est enflé, les muqueuses rouges et bientôt une éruption généralisée grave apparaît, mais il faut bien savoir que lorsque l'éruption apparaît, la maladie est déjà ancienne, l'infection remonte à 8 jours au moins. Souvent toute cette première période passe inaperçue.

La mort peut survenir rapidement dès le 9e ou le 10e jour, au moment où le processus de généralisation s'établit, lorsque le museau devient enflé, rouge, et ce sont là les cas les plus graves; mais le maximum de mortalité paraît être vers le 15e ou le 16e jour de l'infection, dans la semaine qui suit l'apparition des pustules de généralisation, lorsque celles-ci sont larges, étalées, hémorragiques, confluentes; les cas bénins sont marqués par des éruptions discrètes de pustules petites, rapidement desséchées. L'aspect de l'animal permet d'ailleurs de porter des pronostics faciles et les bergers ne s'y trompent guère.

Un certain nombre d'animaux meurent plus tard à la suite

d'infections secondaires, de complications pulmonaires; d'autres deviennent cachectiques à la longue et finissent par mourir après 30 et 40 jours. Toutes les bêtes atteintes gravement et qui se rétablissent sont dépréciées pour longtemps.

La mortalité varie beaucoup suivant les saisons et suivant les races; dans certaines épidémies, sur des troupeaux de même race et à un même moment de l'année, on observe des taux de mortalité très différents.

On doit souvent incriminer des infections secondaires qui aggravent les pertes.

Les précautions, les soins que les bergers prennent de leurs animaux ont une grande importance au point de vue des résultats. Ceux qui connaissent bien la maladie et qui séparent quotidiennement les bêtes atteintes subissent des pertes légères, ils évitent de laisser dans le troupeau les brebis infectées ou qui portent des chancres d'inoculation purulents, gangréneux, fétides; ces pustules fétides répandent dans les bergeries des particules virulentes avec de multiples microbes qui aggravent beaucoup le processus claveleux, de telle sorte qu'on peut voir dans une même région, sur des animaux de même race et à la même époque de l'année, des mortalités qui varient de 2 à 3 0/0 jusqu'à 50 et 60 0/0, suivant les soins donnés au troupeau par un berger plus ou moins compétent.

En Camargue et en Crau, d'une façon générale, les bergers connaissent bien la clavelée et savent isoler leurs malades; cependant les mortalités de 20, 30 0/0 ne sont pas rares sur les métis arlésiens; j'ai pu constater jusqu'à 50 0/0 chez les adultes, et les agneaux jeunes meurent dans des proportions encore plus grandes.

Clavelisation.

Pour combattre cette maladie, les méthodes de vaccination ont été variées à l'infini et non sans raison. Lorsqu'un troupeau est pris sérieusement, lorsque la clavelée n'a pas été « coupée » au début, lorsque le propriétaire est débordé, une clavelisation même mauvaise vaut mieux que la maladie elle-même: les méthodes les plus simples ont souvent donné de bons résultats.

Quelquefois le berger clavelise lui-même à la pointe du couteau, en prélevant le virus sur une bête malade choisie comme porte-vaccin; d'autres souillent avec du pus claveleux des fils

de laine et les placent en séton sous la peau de l'animal à claveliser.

Mais ainsi on opère à l'aveugle; sur un même animal porte-vaccin les pustules peuvent contenir des microbes variés, et les résultats d'une même clavelisation faite avec des pustules diverses sont très différents; souvent de graves mécomptes surviennent, et la méthode ne doit pas être bonne puisqu'elle est rarement employée.

On a cherché des procédés meilleurs : on a voulu employer des virus atténués, mais les conditions de cette atténuation doivent avoir été mal étudiées, elles ne sont pas suffisamment établies pour baser sur l'atténuation de virus une méthode générale et qui mette à l'abri ou d'accidents trop nombreux, ou de manque total de pustules vaccinales. Rien n'est moins démontré que cette atténuation, et il n'existe pas, comme pour le virus charbonneux, de méthode fixe et constante d'atténuation ou d'affaiblissement; il n'existe pas de race de virus claveleux atténué et fixe : le virus pris sur des pustules de passage ou sur des pustules flétries, ou vieilli en ampoule, ou affaibli sous une influence quelconque (oxygène, chaleur, glycérine, antiseptiques) se montre tantôt inactif, tantôt trop virulent.

Or il est de première importance que tous les animaux en état de réceptivité présentent une pustule locale au point d'inoculation.

En effet, si après 15 ou 20 jours, à la suite d'une mauvaise clavelisation, 50 0/0 des animaux ont des pustules et quelques autres ne montrent rien, ces derniers sont exposés à une contamination ultérieure. Il est d'autre part tout à fait inutile d'inoculer plus de claveau qu'il n'est nécessaire, et d'augmenter par là soit les dimensions de la pustule, soit les chances de généralisation.

Avec l'inoculation du claveau seul, par les procédés jusqu'ici usités, il est impossible de régler avec certitude ces conditions de la clavelisation; de plus le claveau, récolté par les procédés ordinaires, a le très gros inconvénient de n'être pas homogène, puisque la récolte est faite sur des pustules diverses et nombreuses qui peuvent être souillées par des microbes variés et non définis.

Il ne faut pas se dissimuler que la question n'est pas simple ;
Il a fallu étudier une à une chacune des conditions :

1° L'obtention et la récolte d'un claveau aussi homogène que possible, ne contenant pas, comme microbes d'impureté, des germes dangereux;

2° La conservation du claveau récolté ;

3° La détermination des doses à employer suivant l'âge des animaux et les races à claveliser, par inoculation intra-dermique en mélange avec du sérum spécifique ;

4° Le choix du lieu d'inoculation, le plus favorable et le plus commode dans la pratique.

1° *Récolte du claveau.*

J'ai montré dans un travail antérieur[1] que la clavelée est due à quelque microbe encore inconnu, mais assez petit pour passer à travers des filtres qui retiennent l'immense majorité des microbes ordinaires. Par ce procédé de filtration, il a été facile d'obtenir un virus pur, débarrassé des microbes d'impureté qui souillent le claveau ordinaire récolté sur des pustules quelconques.

Avec le virus pur, dilué dans l'eau physiologique, on a pu faire des inoculations profondes ; le microbe de la clavelée se développe non seulement au niveau de l'ectoderme, mais aussi dans les organes profonds; il donne en particulier dans le tissu cellulaire sous-cutané une culture abondante qui se traduit par la formation d'un tissu œdématié, dense, infiltré de sérosité.

J'ai déjà décrit le procédé employé pour inoculer sur une très grande étendue la paroi abdominale d'une brebis et obtenir une très grande pustule qui donne en une fois une énorme quantité de virus très actif.

Les tissus de cette pustule qui atteind 800 centimètres carrés de surface sont broyés dans un appareil spécial[2] et mis en suspension dans de l'eau physiologique stérile.

La récolte est faite au 8e jour.

Le claveau qui doit servir à la clavelisation est préparé de la façon suivante :

Les tissus œdématiés de la pustule sont récoltés avec les

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, fév. 1903.
2. *Comptes rendus de la Soc. de Biol.*, 20 décembre 1902.

précautions d'asepsie ordinaire; on en obtient sur une seule brebis trois à quatre cents grammes; ces tissus sont découpés en fragments de 1 c. c. environ et introduits dans le broyeur déjà décrit; le broyage est commencé sans addition d'eau physiologique, de sorte qu'il coule d'abord, par expression, une assez grande quantité de liquide claveleux pur, 100 c.c. en moyenne; on continue ensuite le broyage en fractionnant et en ajoutant chaque fois de nouvelles quantités d'eau physiologique; *le jus claveleux recueilli d'abord, dilué à 1 litre dans les premières portions du liquide passé dans le broyeur constitue notre claveau.* — Les ampoules de virus destinées à la clavelisation sont faites uniquement avec ce mélange.

Il reste encore beaucoup de virus dans le broyeur, on ajoute de nouvelles quantités d'eau, et on continue le broyage pour mettre en suspension tous les tissus virulents dans 2 ou 3 litres de liquide. — Tout le virus ainsi récolté et le claveau non utilisé en ampoules, sert à l'immunisation des animaux qui fournissent le sérum.

2° *Conservation du claveau.*

On sait que le virus claveleux se conserve très bien en ampoule close, à basse température et à l'abri de la lumière ; il est très sensible à l'action de la chaleur ; même à l'abri de l'air il est tué en peu de temps à 45°; il disparaît en 48 heures à une température de 37°.

Tout semble se passer comme si dans le claveau, à côté du virus, il y avait des substances nuisibles pour le microbe, et dont l'action serait d'autant plus rapide que la température est plus élevée.

A 0° et au-dessous, la conservation du claveau est très longue.

Le virus claveleux récolté par le procédé que j'ai indiqué peut être considéré comme pur ; souvent j'ai ensemencé au moment de la récolte, 1 c.c. sans obtenir le moindre développement microbien. — Mais il est bien certain que toujours quelques microbes d'impureté sont introduits par les manipulations, et ces microbes donneraient des cultures abondantes, aérobies, puis anaérobies, si le claveau n'était pas conservé à très basse température en ampoules closes.

Il y a donc tout avantage à conserver au laboratoire central,

dans une bonne glacière, les tubes clos qui constituent la provision du claveau.

La glycérine ne peut être employée comme agent de conservation de longue durée; à 30, 40, 50 0/0 elle atténue rapidement et fait bientôt disparaître toute virulence.

La glycérine peut seulement servir pour empêcher le développement des microbes d'impureté, lorsque le virus doit être sorti de la glacière du laboratoire et expédié.

Il sera tout à fait pratique de glycériner à 30 0/0 les ampoules de virus qui doivent voyager, à condition que ces ampoules soient utilisées *dans les huit jours* qui suivent le moment de l'expédition : pendant le voyage, le virus sera toujours maintenu à une température aussi basse que possible.

L'expérience de toute une année et des clavelisations nombreuses faites en toute saison démontrent qu'on peut compter sur une bonne conservation du claveau dans ces conditions, et que, pendant un mois au moins, le claveau récolté pourra être utilisé dans la pratique de la clavelisation.

Malgré tout, il faut bien savoir que le claveau sorti de l'organisme du mouton va tout de suite en s'atténuant, et que le claveau employé après un mois de conservation devra être tenu pour moins actif que le claveau récemment recueilli. Pour nos races françaises, plus sensibles, il faudra employer du virus plus ancien et moins actif que pour les moutons algériens, diminuer ou augmenter les doses suivant les cas.

Cette clavelisation peut être faite de deux façons, soit par inoculation superficielle à la lancette, par scarification ou par piqûre, soit à la seringue, par inoculation intradermique, en se servant dans le premier cas, de claveau non dilué, et dans le deuxième cas de dilutions plus ou moins étendues. En France, beaucoup d'expérimentateurs ont essayé la clavelisation par les méthodes les plus diverses ; j'ai fait moi-même quelques expériences avec l'inoculation de claveau pur, dilué simplement dans de l'eau physiologique, et j'ai dû reconnaître que sur nos races françaises, il était impossible de claveliser avec certitude, à l'abri de tout accident de généralisation, si on ne faisait pas intervenir un nouveau facteur : *le sérum anticlaveleux*.

3° *Production du sérum anticlaveleux.*

Il est possible d'obtenir un sérum spécifique actif, en inoculant à des moutons guéris de la clavelée des quantités de plus en plus considérables de virus claveleux.

J'ai donné, dans ces *Annales*, les détails de la préparation du sérum, et des expériences de laboratoire faites sur des moutons de la région parisienne ont montré que par l'inoculation de 20-30 c. c. de sérum, 24 heures avant l'inoculation du virus, on pouvait empêcher le développement de la maladie et même de la pustule d'inoculation.

Les témoins inoculés avec la même dose de virus présentent une énorme pustule d'inoculation et des accidents de généralisation souvent mortels.

Des expériences de laboratoire ont montré aussi une action très évidente du sérum sur le virus inoculé après mélange *in vitro*.

Suivant les quantités de sérum employées, on peut avoir un moindre développement de la pustule, un retard dans la période d'incubation, l'absence d'accidents de généralisation ou même de toute réaction locale au point d'inoculation.

En partant de ces données expérimentales, j'ai résolu d'étudier dans la pratique un procédé de clavelisation basé sur l'emploi simultané du virus et du sérum anticlaveleux.

Expériences de séro-clavelisation à Arles.

Les expériences que je vais maintenant rapporter en détail ont été faites dans la Camargue et la Crau, sur des animaux dits métis arlésiens, avec le concours de MM. Arnaud, Brun, Gombert, vétérinaires à Arles; M. Sicard, vétérinaire à Saint-Rémy. Je suis heureux de pouvoir les remercier du concours très amical qu'ils ont bien voulu me prêter.

Mon intention était d'abord d'utiliser pour la pratique de la clavelisation, dans ces régions où la clavelée sévit d'une façon permanente, des mélanges de virus et de sérum en proportions telles que les pustules obtenues soient de petites dimensions, rapidement guéries et sans danger aucun de généralisation grave, en n'employant que de petites quantités de sérum. Ce résultat idéal peut être obtenu facilement au laboratoire sur des individus

isolés, de même âge, très sensibles, issus de parents indemnes de clavelée; mais dans les conditions de la grande pratique, dans un pays où la clavelée sévit tous les ans, où il s'agit de vacciner dans un même troupeau des animaux d'âges très différents, il est arrivé que des mélanges de virus et de sérum parfaitement homogènes donnaient les résultats les plus divers sur les animaux d'un même troupeau, bien que tous les animaux fussent inoculés à la seringue et avec les mêmes doses : un certain nombre avaient de trop grosses pustules, d'autres des pustules moyennes ou petites, et beaucoup n'avaient aucune réaction locale : par conséquent pas d'immunité. Les résultats obtenus d'abord, trop inconstants, et qui pêchaient surtout par défaut de pustules, n'ont pas permis, en France du moins, de baser sur ce principe une méthode générale de clavelisation : pour être sûr d'obtenir 100 0/0 de pustules, il a fallu ou diminuer la dose de sérum ou augmenter la quantité de virus dans des proportions telles qu'une certitude manquait.

Une première expérience d'orientation fut faite, fin mars 1902, au mas de Pillet, sur un troupeau appartenant à MM. Peyre frères; étaient présents : M. Martel, alors inspecteur du service sanitaire au ministère de l'Agriculture, et M. Arnaud, vétérinaire à Arles.

Pour bien se rendre compte de l'action du sérum en mélange, on opéra sur un lot de 60 animaux : 30 brebis et 30 agneaux.

15 brebis, 15 agneaux reçurent une dilution de virus claveleux conservé au laboratoire depuis un mois, et dilué au moment de l'inoculation dans des quantités *variables* d'eau physiologique.

15 brebis, 15 agneaux reçurent le même virus dilué dans du sérum spécifique dans les mêmes proportions.

L'inoculation fut faite à la seringue, toujours à la dose de 1/10 de centimètre cube à la face interne des cuisses. On inocula parallèlement des dilutions au 1/20, au 1/100, au 1/500, au 1/1000.

Avec la dilution dans l'eau, tous les animaux inoculés, sauf 2 agneaux, eurent des pustules; il y eut 50 0/0 de généralisation; 2 brebis moururent, l'une inoculée au 1/20, l'autre inoculée au 1/1000.

Avec la dilution dans le sérum, l'inoculation au 1/1000 donna 0 pustule; l'inoculation au 1/500 donna sur les agneaux 1 pus-

tule sur 6; sur les brebis 3 pustules sur 6; au 1/100 et au 1/20, il y eut des pustules sur tous les animaux, dans aucun cas il n'y eut de généralisation.

Cette expérience prouva une action évidente du sérum en mélange, inoculé à la dose de 1/10 de centimètre cube : une dilution du virus au 1/500 dans le sérum pouvait donc être inoculée à la seringue sans danger; c'est ce qui fut confirmé 15 jours plus tard sur 400 bêtes : 200 brebis, 200 agneaux.

L'inoculation du même virus, *plus âgé de 15 jours*, dilué au 1/500 dans le sérum, fut pratiquée à la dose de 1/10 de centimètre cube sur le thorax.

Huit jours après, le troupeau fut examiné en détail; résultat :

45 0/0 de pustules sur les brebis;

5 0/0 de pustules sur les agneaux;

Aucune généralisation.

La dose inoculée était insuffisante.

Le même jour, on fit aux manquants une nouvelle inoculation de virus de 1 mois dilué au 1/250; résultat 8 jours après :

60 0/0 de pustules sur les brebis;

5 0/0 de pustules sur les agneaux ;

Pas de généralisation.

La dose inoculée était encore insuffisante; la résistance des agneaux vis-à-vis de l'inoculation du mélange virus-sérum était surtout remarquable, et ce résultat s'est toujours confirmé par la suite. Pour la troisième fois, les animaux qui n'avaient pas eu de pustules furent réinoculés avec une dilution au 1/100 et reçurent en même temps, en un autre point, 5 c. c. de sérum pour éviter les chances de contamination possibles si le résultat de l'inoculation virulente était encore négatif : toutes les brebis eurent des pustules, et environ 60 0/0 des agneaux.

Ceci peut être donné comme un type d'expérience d'orientation, mais non comme un type de bonne clavelisation; une méthode qui demande, pour être à l'abri de tout accident de généralisation claveleuse, 2, 3, 4 inoculations successives à 8 jours d'intervalle, serait tout à fait impraticable.

Pour un premier essai sur les moutons de la race arlésienne, je tenais surtout à ne pas avoir d'accident de clavelisation, et j'avais commencé par des doses très faibles, me réservant d'augmenter progressivement ces doses.

Je dois surtout remercier les frères Peyre de la confiance qu'ils m'ont témoignée en me laissant opérer sur une partie de leur troupeau.

Dans ce même mas et pendant toute la durée de l'expérience, 200 agneaux, qui avaient reçu préventivement 10 c. c. de sérum, restèrent et sont restés indemnes de clavelée.

De nouveaux essais de séro-clavelisation furent faits ultérieurement sur d'autres troupeaux claveleux.

Au grand Manusclat, en Camargue, la clavelée sévissait sur un troupeau appartenant à M. Bertrand : 600 brebis, 400 agneaux.

Une nouvelle expérience d'orientation fut faite d'abord sur 60 agneaux et 20 brebis, pour déterminer l'action de doses plus fortes de virus, et aussi l'action de virus plus ou moins vieux Un certain nombre d'animaux furent inoculés sur le thorax, un certain nombre à la queue [1].

1° 15 agneaux reçurent à la queue du virus de 1 mois en dilution dans l'eau ;
2° 15 agneaux + 5 brebis reçurent à la queue du virus de 1 mois en dilution dans le sérum;
3° 15 agneaux + 5 brebis reçurent sur le thorax du virus de 1 mois en dilution dans le sérum;
4° 15 agneaux + 5 brebis reçurent à la queue du virus de 5 jours en dilution dans le sérum :
5° 5 brebis reçurent sur le thorax du virus de 5 jours en dilution dans le sérum.

Le lot n° 1 donna 100 0/0 de pustules et quelques accidents de généralisation peu graves.
Le lot n° 2 donna 100 0/0 de pustules sans généralisation.
Le lot n° 3 donna 75 0/0 de pustules chez les agneaux, 100 0/0 sur les brebis.
Le lot n° 4 donna 100 0/0 sans généralisation.
Le lot n° 5 donna 100 0/0 avec grosses pustules et quelques pustules de généralisation sans gravité.

Cette expérience mit encore en évidence la résistance beaucoup plus grande des agneaux; elle montra surtout les avantages de l'inoculation à la queue (lorsque celle-ci n'a pas été coupée), au point de vue des suites de la clavelisation.

Les pustules sur le thorax, dont quelques-unes étaient assez développées, furent longues à cicatriser (35 et 40 jours), tandis que les animaux inoculés à la queue furent rapidement guéris par l'amputation de la queue au 18e jour.

1. Une ampoule de claveau de 1 c. c. est mélangée à 9 c. c. de sérum, et chaque animal reçoit 1/10 c. c. du mélange. Soit 1/10 c. c. de sérum contenant 1/100 de centimètre cube de virus.

A un autre point de vue, cette inoculation doit encore être préférée, puisque le même virus inoculé à la même dose donne 100 0/0 lorsque l'inoculation est faite à la queue et 75 0/0 lorsque l'inoculation est faite sur le thorax.

Le 15 mai, le troupeau tout entier fut clavelisé :

1° 200 agneaux inoculés à la queue avec du virus de 5 jours dilué au 1/100 dans le sérum et à la dose de 1/10 de c. c. du mélange.

2° 150 agneaux inoculés à la queue avec le même mélange reçurent en plus 2 c. c 5 de sérum au flanc ;

3° 400 brebis inoculées à la queue avec du virus de 3 semaines dilué au 1/100 dans le sérum et à la dose de 1/10 de centimètre cube du mélange ;

4° 60 brebis inoculées à la queue avec du virus de 5 jours dilué au 1/100 dans le sérum et à la dose de 1/10 de centimètre cube du mélange.

5° 140 brebis inoculées sur le thorax avec du virus de 5 jours dilué au 1/10 dans le sérum et à la dose de 1/10 de centimètre cube du mélange.

Résultats : Le lot n° 1 eut 100 0/0 de pustules. et présenta au 9e jour un certain nombre de généralisations qui nécessitèrent l'inoculation de 5 ou 10 c. c. de sérum; la dose était trop forte. Grâce au sérum inoculé au 9e jour, il n'y eut aucun accident.

Le lot n° 2 donna 100 0/0 de pustules sans généralisation, grâce au sérum inoculé en même temps que le virus ; les dimensions des pustules étaient plus petites que celles du lot n° 1.

Le lot n° 3 montra 95 0/0 de pustules sans généralisation.

Le lot n° 4 eut 100 0/0 de pustules avec 6 généralisations sérieuses, pas de mortalité grâce à l'inoculation de 10 c. c. de sérum au 9e jour.

Le lot n° 5 eut 90 0/0 de pustules avec 8 généralisations dont 2 mortelles, malgré l'inoculation de sérum au 9e jour.

Cette expérience fut très instructive, parce qu'elle me montra le danger possible de l'inoculation des mélanges virus-sérum seuls; les résultats en ont été corroborés par ceux d'une expérience faite parallèlement, au mas de Servane et au mas de Paillan chez M. Lafond, sur un nombre égal d'animaux inoculés sur le thorax, avec les mêmes doses du même virus.

Le 3 mai, au mas de Servane comme au Manusclat, une expérience d'orientation fut faite, et 143 brebis grasses, donc très sensibles, avaient été inoculées au flanc avec du virus de 1 mois dilué au 1/100 dans le sérum, le résultat 8 jours après fut :

50 0/0 de pustules. Pas de généralisation.

Le 13 mai, les brebis qui n'avaient pas eu de pustules furent réinoculées avec du virus de 5 jours à 1/75 dans le sérum.

Le même jour, le troupeau principal au mas de Paillan fut aussi clavelisé. — Ce troupeau comprenait 480 brebis et 140 agneaux; plus de 80 brebis ou agneaux avaient déjà été

reconnus atteints de clavelée et éliminés du troupeau, 20 étaient déjà morts.

Les brebis furent inoculées sur le thorax, avec du virus de 3 *semaines* dilué au 1/75 dans le sérum à la dose de 1/10 de centimètre cube du mélange.

Les agneaux considérés comme plus résistants reçurent les mêmes doses d'un *virus de* 5 *jours* sur le thorax.

A Servanne, sur les brebis, au mas de Paillan sur les agneaux, tous animaux inoculés avec du *virus de* 5 *jours*, les pustules commencèrent à paraître dès le *commencement du* 3e *jour;* la dose était évidemment trop forte : étant donnée la courte période d'incubation, des accidents sérieux étaient à prévoir; tous ces animaux reçurent au 4e jour 5 c. c. de sérum.

Le résultat de l'inoculation du sérum fut excellent et déjà vers le 8e jour on put constater que les pustules étaient flétries, nodulaires, en voie de guérison; en effet, ces animaux furent plus rapidement guéris que les brebis ayant reçu du virus de 3 semaines et qui avaient été laissées sans inoculation adjuvante de sérum. Grâce au sérum, la vaccination du troupeau se trouva réalisée dans d'excellentes conditions et il n'y eut pas un seul accident de généralisation.

A partir de ce moment, et en présence des résultats concordants obtenus au Grand Manusclat en Camargue et au mas de Paillan en Crau, il fut évident pour moi qu'on ne pouvait compter, en France, sur l'inoculation de mélanges virus-sérum pour la clavelisation certaine des troupeaux infectés : suivant les cas, l'âge du virus, la sensibilité variable des animaux, on pouvait être exposé à des accidents de clavelisation ou à des insuccès trop nombreux.

Or, en clavelée, les insuccès de vaccination sont à redouter autant que les généralisations après vaccination; toutes les expériences que j'ai faites démontrent que l'immunité n'est acquise qu'à la suite du développement de la pustule; des contaminations vers le 15e, 20e jour seraient certaines dans un troupeau où 50, 60 0/0 seulement des animaux clavelisés auraient présenté des pustules à la suite de l'inoculation du mélange virus-sérum.

Ces contaminations ne sont plus à redouter si la clavelisation se fait avec une inoculation adjuvante de sérum, à la dose de 5 c. c. en moyenne.

Le sérum n'a que des avantages et un seul inconvénient : celui d'élever dans des proportions notables le prix de clavelisation.

1° Avec le sérum, sur les races ovines du midi de la France, on peut augmenter les doses du virus inoculé en mélange avec le sérum; on pourra même faire des inoculations à la lancette avec du virus pur, sans être exposé à des accidents de généralisation grave ;

2° Les contaminations dans le troupeau infecté ne sont plus à redouter; à partir du moment de l'inoculation, les animaux encore indemnes ou en incubation de maladie seront sûrement protégés; or en France la clavelisation se fera toujours dans des troupeaux déjà infectés; l'inoculation du mélange virus-sérum ou du virus seul n'empêcherait nullement le développement de la maladie sur les animaux en imminence de clavelée, ou la contagion pendant les 4 ou 5 jours qui précèdent le développement de la pustule de vaccination; de ce chef, le propriétaire du troupeau pourrait subir des pertes sérieuses qu'il évitera avec l'inoculation du sérum : tel est le cas par exemple très bien mis en évidence par la vaccination du troupeau de M. Durieux, au petit mas Thibert. Sur 200 brebis constituant le troupeau, 45 étaient claveleuses ou en incubation de clavelée au moment de la vaccination; grâce au sérum inoculé, il y a eu seulement 2 morts sur ces 45 bêtes, tandis qu'avant l'inoculation du sérum 3 brebis sur 4 étaient déjà mortes.

On ne saurait trop insister sur la nécessité du sérum; en dernière analyse, le proprétaire du troupeau y trouvera toujours grand bénéfice puisque la vaccination est faite une fois pour toutes et que l'immunité obtenue par l'inoculation virulente, pratiquée en même temps que l'inoculation du sérum, dure toute la vie de l'animal, à de rares exceptions près.

Cette méthode a été appliquée déjà sur un grand nombre d'animaux et a donné d'excellents résultats.

— Au mas de Paillan, le 21 mai, 75 béliers à queue longue furent inoculés à la queue avec du virus de 15 jours dilué dans le sérum au 1/100, à la dose de 1/10 de centimètre cube du mélange; ils reçurent en même temps 5 c. c. de sérum : résultat 100 0/0 de pustules uniques sans généralisation.

Au 17e jour, les queues furent coupées et les animaux guéris

plus rapidement que ceux du troupeau principal du même mas inoculés au flanc.

— Le 3 juillet, au mas de Pernes, chez M. Richelme, 900 brebis, 200 agneaux furent inoculés à la queue avec une dilution de virus de 1 mois dans le sérum au 1/100; 150 brebis à queue courte furent inoculées sur le thorax. Tous ces animaux reçurent au flanc 4 c. c. de sérum: le virus avait 1 mois de date, il y eut seulement 90 0/0 de pustules (les animaux inoculés au flanc avaient surtout fourni les manquants).

30 brebis furent trouvées claveleuses au moment de l'inoculation, et un certain nombre étaient certainement en incubation de maladie.

La mortalité par clavelée fut nulle; 10 animaux moururent d'infection septique, aux dires du propriétaire, à la suite de la section de la queue, pendant les chaleurs du mois de juillet en Crau.

— Le 3 juillet, au mas de Reillon, le troupeau de M. Eynaud, (850 brebis) était atteint par la clavelée; sur 40 brebis déjà malades, 16 étaient mortes.

La clavelisation fut faite sur le thorax avec virus de 8 jours au 1/100 dans le sérum; et on donna 5 c. c. de sérum au flanc.

Résultat 95 0/0 de pustules; un certain nombre de pustules étaient relativement grosses, enflammées soit par les mouches, soit par le fumier de la bergerie où le propriétaire avait laissé ses animaux, malgré la recommandation contraire; 4 brebis présentèrent des accidents septiques graves et moururent tardivement.

Il ne fut remarqué aucune généralisation claveleuse.

— Le 5 juillet, à la Mérindole, chez M. Cornille, un troupeau de 210 brebis grasses était infecté de clavelée; la mortalité était considérabble. Sur 20 malades, 11 brebis étaient déjà mortes.

La clavelisation fut faite avec le concours de M. Brun. 10 brebis furent trouvées malades, au début de l'éruption; le résultat fut excellent, il n'y eut plus un seul cas nouveau de clavelée et les brebis malades au moment de l'inoculation guérirent rapidement.

Dans ce même troupeau, se trouvaient 40 agneaux jeunes, de 1 à 15 jours, tétant les mères clavelisées; ces agneaux devaient être rapidement livrés à la boucherie, ils ne furent pas

clavelisés, mais reçurent 10 c. c. de sérum anti-claveleux. — Tous restèrent pendant 40 jours en contact avec les mères malades : aucun ne prit la clavelée; on sait combien les jeunes agneaux sont sensibles à l'infection naturelle, et que sur eux la mortalité est très considérable : 80, 90 0/0.

— Le 13 juillet, au petit mas Thibert, chez M. Durieux, un troupeau de 200 brebis et 90 agneaux jeunes, était atteint par le clavelée.

Sur 3 bêtes malades avant l'inoculation, 2 étaient mortes. Au moment de la clavelisation, 15 brebis furent trouvées malades, au début de l'éruption claveleuse. Ces brebis reçurent 10 c. c. de sérum. Le restant du troupeau reçut 5 c. c. et fut inoculé sur le thorax avec du virus de 2 jours au 1/75 dans le sérum. Beaucoup de brebis (90) étaient sur le point de mettre bas. Les agneaux jeunes furent traités préventivement avec 10 c. c. de sérum.

Huit jours après, le troupeau fut revu, les pustules étaient grosses; 30 brebis n'avaient pas de pustule de clavelisation, et montraient pourtant des pustules discrètes de généralisation à la période de sécrétion. Ces 30 brebis étaient donc déjà en incubation de maladie le jour de l'inoculation.

Il y avait donc 45 bêtes en danger, au moment de l'intervention, et pourtant, grâce aux 5 c. c. de sérum, il y eut seulement 2 nouvelles morts.

De même les 90 agneaux qui avaient reçu 10 c. c. de sérum et n'avaient pas été clavelisées sont restés, comme à la Merindole, en contact avec les mères claveleuses pendant plus de 10 jours; aucun cas de clavelée n'est survenu jusqu'au moment où ces agneaux ont été livrés à la boucherie.

Il n'est survenu aucun cas de généralisation chez les brebis pleines, bien que l'état gravide soit considéré comme une cause d'aggravation du processus claveleux; au 10 août, le troupeau était complètement guéri.

Toutes les inoculations et les expériences que je viens de rapporter ont été faites par moi-même, et j'ai chaque fois examiné les animaux un par un, pour contrôler les résultats de la clavelisation. Depuis, et en employant la même méthode, les vétérinaires d'Arles ont fait de nombreuses vaccinations.

Le 22 juillet, un troupeau de 75 bêtes fut vacciné par

M. Brun avec le même procédé, et dans le courant du mois d'août, de nouvelles clavelisations ont été faites par M. Arnaud, par M. Brun, par M. Gombert, vétérinaites à Arles, par M. Picard, vétérinaire à Saint-Rémy, au mas de Capelle (150 brebis), au mas de Sourdun (130 brebis), au mas de Mourgues (120 brebis), au petit mas de Fontvielle (130 brebis), à Mouriès chez M. Chauvet (150 brebis), [à Maussane (100 brebis), etc., etc.

Dans le courant de l'année, depuis le mois de mars, les expériences ont porté sur plus de 10,000 animaux, et la mortalité du fait de la clavelisation a été nulle.

De tous ces essais, faits dans les conditions les plus diverses, avec des virus d'âge différent, conservés à des températures variables, avec glycérine et sans glycérine, inoculés avec des doses variables de sérum et en des points variés du corps du mouton, on peut tirer les conclusions suivantes :

Le virus claveleux, préparé par la méthode ci-dessus exposée, conservé à la glacière, reste assez constant pendant 1 mois au moins. Il peut être expédié après addition de glycérine, à condition d'être utilisé dans les 8 jours.

L'inoculation du virus claveleux dilué dans l'eau, sans sérum, faite à la seringue, doit être considérée comme dangereuse.

L'inoculation de virus claveleux dilué dans le sérum, et inoculé à la dose de 1/10 de centimètre cube, ne met pas à l'abri de tout accident, si on emploie un virus jeune ou une quantité de virus assez grande pour obtenir à coup sûr 100 0/0 de pustules.

Les agneaux sont beaucoup plus résistants que les adultes à l'inoculation de mélange virus-sérum.

L'inoculation à l'extrémité de la queue sera toujours pratiquée sur les agneaux à queue longue, et sur les adultes qui n'auront pas déjà subi l'amputation de la queue.

Cette inoculation se fait très simplement lorsque le berger a préalablement coupé la laine; la pustule développée est très visible, et la section de la queue après développement de la pustule permet une guérison très rapide de l'animal.

Sur les animaux à queue coupée, pour l'inoculation à la seringue du mélange virus-sérum, il faut choisir de préférence la région costale, en arrière du point où frotte le membre anté-

rieur, à la limite de la région où la peau est fine et glabre.

Cette inoculation doit être très superficielle et donner une petite *cloque* superficielle; on évite ainsi le développement de trop grosses pustules susceptibles de s'infecter ultérieurement.

L'inoculation à la cuisse n'offre aucun avantage.

L'inoculation à l'oreille n'est pas pratique lorsqu'on emploie pour la clavelisation des dilutions de virus dans le sérum, inoculées à la seringue.

Pour obtenir d'encore meilleurs résultats, au point de vue des suites de la clavelisation, je me propose de faire des essais d'inoculation à l'oreille, avec le virus non dilué inoculé par de multiples pointes fixées autour de l'orifice de l'aiguille de la seringue qui contient le virus.

Dans tout les cas, et quel que soit le procédé d'inoculation utilisé, la clavelisation ne sera faite qu'avec une inoculation adjuvante de sérum (5 c. c. en moyenne), sur les animaux de race française, dans les pays où cette clavelisation est nécessaire.

SÉROTHÉRAPIE ANTI-CLAVELEUSE

Les expériences de sérothérapie claveleuse que je vais maintenant rapporter prouvent que la clavelisation sera tout à fait inutile dans les régions où cette maladie ne constitue qu'un accident passager.

Le sérum, employé seul, suffira pour enrayer le développement de foyers claveleux et pour traiter efficacement les troupeaux infectés, de façon à éteindre la maladie. Le traitement par le sérum sera toujours beaucoup plus facile et mieux accepté que la clavelisation : de nombreuses expériences faites en diverses régions de la France, dans le courant de l'année 1902-1903, ont montré que l'immunité ainsi obtenue était d'assez longue durée pour n'avoir pas à craindre de retour offensif de la maladie ; les troupeaux traités sont restés définitivement indemnes.

La première expérience de sérothérapie anticlaveleuse fut faite à Caudry, dans le département du Nord, avec le concours de M. Eloire, vétérinaire; j'ai rapporté cette expérience en détail dans un mémoire antérieur.

Au 10 octobre 1902, le troupeau claveleux formé de 50 moutons était parqué en plein champ; 8 animaux étaient

déjà morts, 5 étaient guéris, 17 étaient en incubation de maladie ou au début de l'éruption, 17 paraissaient sains.

On inocula une dose énorme de sérum, 40 c. c. par tête.

Le résultat fut parfait, puisque il ne mourut qu'un seul animal, le lendemain de l'inoculation; chez tous les autres, la maladie fut enrayée ou empêchée.

La deuxième expérience fut faite, le 1er novembre 1902, chez M. Anselin, avec le concours de M. Stourb, vétérinaire départemental, et M. Mignot, vétérinaire traitant.

Les animaux, au nombre de 154, se répartissaient ainsi :

36 brebis mortes;

20 en période du pustulation (4 brebis couchées);

62 sains ou au début de la maladie;

36 en voie de guérison avec pustules sèches.

Tous les animaux, sauf 27 déjà manifestement guéris, reçoivent 20c. c. de sérum.

Le résultat fut encore excellent puisqu'aucune brebis n'a succombé, et les malades se sont rapidement rétablies.

—Au mois de janvier 1903, à Anzat-le-Luguet, dans le village de Reyrolles (Haute-Loire), un foyer claveleux fut signalé au service sanitaire.

Le village est situé à 1,100 mètres d'altitude, et la neige couvrait le sol.

Le premier troupeau atteint et traité comprenait 22 brebis et 13 agneaux.

Toutes les brebis étaient malades et 4 agneaux sur 12.

Les brebis reçurent 20 c. c. de sérum, les agneaux 5 c. c.

8 brebis trop gravement atteintes moururent malgré le sérum, ainsi que 3 agneaux; les agneaux non malades au moment de l'inoculation restèrent indemnes, l'un d'eux têta successivement 3 mères claveleuses.

— Le deuxième troupeau de Reyvolles, traité plus tardivement le 30 janvier, comprenait 58 moutons et 20 agneaux.

A cette date, M. Pitiot ne put inoculer que les 20 agneaux et 3 brebis à la dose de 4 c. c. pour les agneaux, de 20 c.c. pour les brebis.

Le 7 février les brebis purent être inoculées, elles étaient divisées en 2 lots, l'un de ces lots était resté isolé et paraissait indemne (16 brebis), l'autre lot était en pleine clavelée : sur 39,

6 seulement furent trouvées indemnes; toutes les brebis reçurent 10 c. c. de sérum.

Résultat : 8 morts sur les brebis. Les 16 brebis inoculées préventivement sont restées indemnes;

3 agneaux malades au moment de l'inoculation et n'ayant reçu que 4 c. c. de sérum sont morts; les autres, malgré la faible dose de sérum, sont restés indemnes.

Dans le même village, tous les moutons furent inoculés avec 10 ou 20 c. c. de sérum, il y avait 239 brebis et 82 agneaux; malgré la contagion facile par le voisinage des bergeries et les relations des propriétaires, tous ces animaux sont restés indemnes; au 27 février, le foyer pouvait être considéré comme éteint.

La mortalité globale dans le village de Reyrolles, traité par le sérum, a été de 27 animaux sur 475, soit 5 0/0.

— Au même moment, sur des troupeaux voisins non traités, la mortalité était énorme. 252 moutons sur 487 mouraient à Plauzat, 47 0/0; 23 moutons sur 37 à Dauzat-sur-Vodable, 60 0/0; il faut savoir que la clavelée, en hiver, à 1,100 mètres d'altitude, est particulièrement meurtrière.

Au mois de mars 1903, un nouveau foyer claveleux fut signalé en Auvergne, à Moriat. Je me rendis sur les lieux avec M. Martel, inspecteur au ministère, et M. Pitiot, vétérinaire départemental.

2 troupeaux communaux étaient atteints par la clavelée, les intéressés n'ont déclaré la maladie qu'après avoir eu connaissance des bons résultats obtenus à Reyvolles.

Le 21 février, au moment de l'intervention du service sanitaire, les malades avérés étaient au nombre de 52, sur un total de 583 moutons. Il y avait eu 9 morts.

1er troupeau : 219 adultes, 131 agneaux, 350 têtes.

2e troupeau : 137 adultes, 92 agneaux, 229 têtes.

Le 3 mars on comptait 19 morts; 16 dans le troupeau n° 1, 3 dans le troupeau n° 2.

Le 6 mars, 30 morts, — 92 malades.

L'inoculation du sérum à la dose de 6-7 c. c. fut pratiquée le 6 mars sur le troupeau n° 1 (malades et non malades).

La mortalité totale, malgré le haut degré d'infection du troupeau, n'a été que de 12 0/0.

Sur le troupeau n° 2, les résultats ont été encore meilleurs,

parce qu'il était moins infecté au moment de l'intervention.

Sur 239 bêtes, il y avait 4 morts, 19 malades.

Cinq cas de mort ont eu lieu dans la semaine qui a suivi l'application du sérum.

A partir de ce moment la maladie a été arrêtée.

La mortalité a été de 2,85 0/0.

La mortalité pour le village de Moriat a été de 8,8 0/0; dans les villages voisins, elle a été de 45 et 50 0/0. Le foyer a été définitivement éteint.

J'ai eu l'occasion de faire, à Arles, un certain nombre d'inoculations de sérum seul, à la dose de 5 ou 10 c. c. pour le traitement ou la prévention de la clavelée dans les troupeaux infectés.

Je signalerai comme particulièrement démonstratives les expériences faites sur les agneaux nouveau-nés restés en contact avec les mères claveleuses. Après l'injection de 10 c. c. de sérum, ces animaux très sensibles ont pu rester avec la mère infectée et échapper à la contagion jusqu'au moment où ils ont été livrés à la boucherie, vers le quarantième ou cinquantième jour.

A la Mérindole, chez M. Cornille, 40 agneaux ont été ainsi traités.

Au petit mas Thibert, 90 agneaux ont été dans des conditions identiques.

— Comme expérience de sérothérapie préventive, je citerai le traitement du troupeau de M. Roudier, au mas du Juge, en Camargue; vu avec M. Arnaud.

Le troupeau était formé de 500 têtes : 350 brebis, 150 agneaux; la clavelée avait commencé depuis 15 jours, 4 bêtes étaient malades, 1 agneau mort.

Tout le troupeau fut inoculé le 12 juillet avec 5 c. c. de sérum, et il ne survint plus un seul cas de clavelée; le troupeau put passer l'inspection sanitaire et partir en montagne dès le vingtième jour.

A la même époque la clavelée sévissait sur le troupeau de M. Rigaud en Camargue : sur 800 brebis, 450 avaient déjà eu la clavelée et le troupeau était formé de 2 lots, d'une part les brebis malades, d'autre part les brebis encore indemnes.

Le lot indemne reçut du sérum à raison de 10 c. c. par

tête ; depuis il ne s'est plus produit un seul cas de clavelée.

La question la plus intéressante et qu'il est encore impossible de trancher est la suivante : Quelle est la durée de l'immunité conférée par le sérum anticlaveleux ?

Une expérience de laboratoire permet de conclure qu'elle est au moins de 40 jours, et les expériences faites dans les conditions de la pratique répondent avec certitude que cette durée est suffisante pour n'avoir pas à craindre, dans les 2 ou 3 mois, un retour offensif de la maladie en cours.

Il sera intéressant de voir par la suite comment se comportent les animaux simplement traités par le sérum, vis-à-vis de nouvelles réinfections tardives du troupeau après 3 mois, 6 mois, 1 an. Notre conclusion de cette étude sérothérapique sera la suivante ;

Le sérum anticlaveleux, à la dose de 5 ou 10 c. c., suffit pour éteindre un foyer claveleux en cours ; il doit être employé seul dans les pays où la clavelée n'est pas endémique et constitue seulement un accident épidémique.

En France, le département des Bouches-du-Rhône et les départements limitrophes seuls font exception, et la clavelisation peut y rendre de réels services.

En Algérie, la question est d'un ordre tout différent, la clavelée est une maladie sans importance au point de vue algérien ; elle sévit toujours et partout sans que les propriétaires des troupeaux s'en inquiètent ; les animaux porteurs de lésions claveleuses insignifiantes ne sont même pas malades et ne cessent pas de manger ; la mortalité est presque nulle sur les adultes, les pertes sont appréciables seulement sur les agneaux très jeunes, et ceux-ci retireraient grand bénéfice de l'injection de sérum anticlaveleux.

Chez les adultes, il n'y aurait pas à intervenir si les moutons algériens restaient en Algérie et étaient consommés sur place. Mais ce n'est pas le cas, la colonie envoie chaque année à la métropole des milliers d'animaux ; il n'est pas juste que les éleveurs français subissent des pertes considérables du fait de la contagion par le virus algérien apporté chaque année avec les moutons africains. On s'est, avec juste raison, préoccupé en France de cette situation, et Nocard a proposé la clavelisation totale du troupeau algérien ou tunisien.

Si les éleveurs algériens veulent introduire leurs animaux en France et les vendre, ils doivent accepter cette mesure de prophylaxie, qui est de toute justice. Tous les animaux algériens destinés à l'importation en France devront être préalablement clavelisés et guéris, si on veut en finir une fois pour toutes avec une maladie très meurtrière pour le troupeau français.

La clavelisation peut se faire sur les moutons africains sans avoir à redouter des pertes sérieuses, à cause de la résistance bien connue des animaux de cette race ; une longue expérience a montré qu'avec le virus bien préparé, les accidents sont insignifiants; j'ai fait moi-même quelques expériences sur des moutons algériens, importés en Camargue, non clavelisés et j'ai constaté qu'avec des doses fortes de virus-sérum (dilution au 1/20-1/50) l'inoculation de 1/10 de centimètre cube du mélange donnait des pustules nodulaires beaucoup plus rapidement guéries que les pustules obtenues sur les métis arlésiens avec des doses beaucoup plus faibles.

Quelques expériences préliminaires fixeront rapidement sur les doses de virus à employer, et s'il se trouve des espèces particulièrement sensibles, on diminuera la dose de virus ou augmentera la quantité de sérum inoculé. Il sera d'ailleurs toujours possible d'intervenir avec le sérum, vers le huitième ou le neuvième jour, si, sur quelques individus, la clavelisation se présentait avec des tendances fâcheuses.

Cette clavelisation sera peu onéreuse, le prix de revient du virus claveau est insignifiant, puisque avec la méthode que j'ai indiquée, une seule brebis peut fournir de quoi vacciner plus de 200,000 animaux.

La clavelisation pourra être faite par des clavelisateurs attitrés qui acquerront rapidement une très grande expérience et éviteront ainsi des accidents possibles.

Le succès de la clavelisation pourra être constaté par des marqueurs officiels dûment assermentés qui suivront les clavelisateurs à 8 jours, 15 jours ou 3 semaines d'intervalle; eux seuls détiendront la marque et l'imposeront uniquement aux animaux porteurs de pustules.

Seuls, les animaux marqués officiellement pourront être embarqués et expédiés en France. Il est bien entendu que la pustule de clavelisation devra être parfaitement guérie au

moment de l'embarquement des animaux, pour qu'on ne soit pas exposé à voir ce que j'ai vu, de mes yeux, cet été : arriver dans le midi de la France des animaux qui avaient été bien clavelisés, mais qui portaient encore à l'oreille les croûtes claveleuses de l'inoculation.

La question est plutôt d'ordre administratif que d'ordre scientifique ; elle paraît d'une solution facile, si le Gouvernement général la prend en main.

Les conclusions de ce mémoire qui pourrait être intitulé : *De la lutte contre la clavelée en France*, seront les suivantes :

En Algérie, clavelisation obligatoire de tous les animaux destinés à l'exportation, avec marque visible et officielle garantissant la clavelisation antérieure, datant de 2 mois ou au minimum de 50 jours.

Ainsi on évitera les réinfections annuelles des bergeries françaises.

En France, dans les régions où sévit la clavelée d'une façon endémique, et où les chances de réinfection sont nombreuses, on traitera les troupeaux en cours d'infection, on combinera la clavelisation avec le traitement sérothérapique ; les animaux seront cantonnés jusqu'à guérison complète.

Dans le pays où la clavelée est une maladie accidentelle, on se contentera du traitement sérothérapique.

Si les déclarations sont faites à temps aux services compétents et si le sérum est employé au début des épidémies, les pertes par clavelée seront toujours peu élevées.

Comme addendum à ce travail, je dois donner les instructions nécessaires aux vétérinaires traitants pour l'emploi du sérum anti-claveleux ou la pratique de la séroclavelisation.

SÉROTHÉRAPIE DE LA CLAVELÉE

Instruction pour l'emploi du sérum anticlaveleux. — Le sérum anticlaveleux est fourni par des moutons fortement immunisés contre le virus claveleux.

On le délivre en flacons de 20 et 100 c. c. Il conserve longtemps ses propriétés si on le maintient à l'abri de la chaleur et de la lumière (à la cave).

Avant d'utiliser le sérum, il faut s'assurer qu'il est resté limpide; quelquefois le sérum de mouton est opalescent, il peut

y avoir un léger dépôt au fond du flacon, mais ce dépôt n'indique pas une altération.

Le sérum altéré devient laiteux et peut avoir mauvaise odeur : dans ce cas, il ne doit jamais être employé.

La technique de l'inoculation et les précautions à prendre sont les mêmes que pour toutes les inoculations hypodermiques.

Emploi d'une seringue préalablement stérilisée. — Plonger la seringue et l'aiguille dans de l'eau que l'on fait bouillir pendant 1/4 d'heure.

Inoculation dans le tissu cellulaire sous-cutané, de préférence au niveau de l'aisselle, sur les parois costales, dans les régions à peau fine et propre.

Ouvrir les flacons avec précaution, éviter la souillure du sérum. Lorsque la seringue est à recharger, immerger seulement l'extrémité de l'aiguille, etc., etc., toutes précautions d'aseptie aussi rigoureuse que possible dans les conditions de la pratique.

Les flacons de sérum ne doivent être ouverts qu'au moment de l'emploi. Tout flacon débouché doit être immédiatement utilisé (le jour même).

Traitement d'un troupeau claveleux. — Dans un troupeau claveleux, les animaux peuvent être divisés en 3 groupes :

1° Les animaux déjà malades, avec éruption ;

2° Les animaux en incubation de maladie ;

3° Les animaux indemnes.

Le sérum sera utile aux animaux à toutes les périodes de la maladie. Les animaux indemnes au moment de l'inoculation ne prendront pas la maladie ou auront une clavelée légère.

Les animaux en incubation de maladie auront une clavelée moins grave.

Les animaux inoculés au début de la maladie retireront aussi grand bénéfice du sérum, la mortalité sera abaissée et la convalescence des animaux qui résisteront considérablement diminuée.

Les animaux à museau enflé, bouffi, rouge, ceux à éruption confluente seront surtout difficiles à guérir, et le pronostic restera toujours grave.

Il est inutile de donner du sérum aux brebis déjà en voie de guérison, période des pustules sèches à croûtes noire.

L'action du sérum sera rendue évidente par la comparaison des mortalités avant le sérum et après le sérum sur les animaux déjà malades et sur les animaux encore indemnes au moment de l'inoculation.

Le bénéfice sera d'autant plus grand que la quantité du sérum inoculé sera plus considérable.

10 c. c. en moyenne (par bête) donneront toujours un excellent résultat dans le traitement d'un troupeau claveleux.

Suivant l'état du troupeau, le plus ou moins grand nombre de cas déjà constatés, on donnera plus ou moins du sérum.

10 *c. c. dans le cas d'un troupeau où il y aura beaucoup de malades.*

5 *c. c. si la maladie est au début et si on a seulement constaté deux ou trois cas.*

Toujours les malades recevront au moins 10 *c. c.*

A titre préventif, dans un troupeau non encore claveleux, mais très exposé à la contagion, 5 *c. c. suffiront.*

SÉRO-CLAVELISATION

Dans certaines régions, la clavelée est endémique ; les propriétaires risquent tous les ans de voir réapparaître la maladie parce que les troupeaux sont très rapprochés, les chances de réinfection nombreuses ; c'est le cas dans le département des Bouches-du-Rhône, à Arles, à Salon, par exemple. Il ne faudra pas se contenter de l'emploi du sérum à la dose de 5 ou 10 c. c., doses qui suffisent pour éteindre la maladie actuelle, mais qui ne sauraient suffire pour créer une immunité de plusieurs mois, et à plus forte raison de plusieurs années.

Il faudra combiner la clavelisation du troupeau avec le traitement sérothérapique.

Inoculation du sérum.

L'inoculation du sérum à la dose de 5 c. c. sera toujours nécessaire (en France, du moins) d'abord pour éviter des accidents de généralisation grave, toujours possibles ; nécessaire aussi (puisque la clavelisation ne se fera que sur des troupeaux déjà infectés) pour enrayer la maladie chez les animaux en incubation ou pour le traitement des malades. Cette inoculation

du sérum sera faite avec une seringue stérilisable et préalablement bouillie.

Elle peut être pratiquée soit quelques jours avant la clavelisation, soit en même temps et au même moment, soit quelques jours après la clavelisation (1, 2 ou 3 jours).

Il est simplement plus commode et plus rapide de la faire en même temps que l'inoculation virulente, à quelque distance du point d'inoculation du virus.

Clavelisation.

L'Institut Pasteur fournit du virus claveleux contenu dans des ampoules à bouts effilés et fermées à la lampe. Chaque ampoule contient cent doses. Avant l'emploi, l'ampoule sera soigneusement agitée.

L'inoculation de ce virus doit être faite après dilution dans du sérum anticlaveleux.

Pour faire cette dilution, il est expédié, avec l'ampoule de claveau, un tube en verre recourbé (tube à vaccin charbonneux), stérilisé et jaugé à 10 c. c. On introduit dans le tube 10 c. c. de sérum, puis on brise avec une pince les extrémités de l'ampoule qui contient le virus et on mélange ce virus au sérum. Le mélange est soigneusement agité.

La dose à inoculer par animal est de 1/10 de centimètre cube; une seringue stérilisable à aiguille courte et forte sert à faire l'inoculation.

Lieu de l'inoculation. — L'inoculation sera faite de préférence à l'extrême bout de la queue, dans le capuchon terminal, lorsque la queue est longue et n'a pas été coupée; l'aiguille sera franchement plantée dans les tissus et on aura bien soin que le liquide pénètre et reste au point d'inoculation. *L'inoculation à la queue n'a que des avantages.*

Si la queue a été coupée, on fera l'inoculation virulente sur la paroi thoracique où la peau est fine et glabre, en arrière du point où frotte le membre supérieur, à la limite de la région laineuse. L'aiguille sera dirigée parallèlement à la surface, très peu enfoncée, de façon à obtenir au point d'inoculation une petite cloque superficielle.

REVUE DU TROUPEAU SÉRO-CLAVELISÉ

8 ou 9 jours après l'inoculation, le troupeau sera revu; le berger aura fait le triage des vaccinés avec succès et sans succès.

Au flanc, les pustules sont facilement visibles, elles sont de dimensions variables; quelquefois on constatera de simples nodules durs, sous-cutanés, qui suffisent à assurer l'immunité.

A la queue, le succès sera marqué par le gonflement de la région, l'aspect violacé de la peau autour de la piqûre.

S'il y a des manquants, ces animaux seront réinoculés avec du virus redemandé à l'Institut Pasteur et, cette fois-ci, dilué non pas dans le sérum, mais dans l'eau stérile envoyée dans le tube à dilution.

S'il y a au 9e jour des pustules énormes, flasques, envahissantes, ou des boutons de généralisation sérieuse, il sera bon de donner encore 5 c. c. de sérum ou même 10, si la généralisation est tout à fait sérieuse. Mais le cas se présentera rarement.

Ultérieurement, les pustules développées au flanc guériront peu à peu, au plus en 35 ou 40 jours. A partir du 15e, lorsque la croûte de la pustule tombera, on évitera de trop faire marcher les animaux, on entretiendra de la litière propre et fine, sans toutefois *curer* la bergerie et mettre en suspension des poussières suspectes.

S'il y a des pustules qui s'infectent, on les soignera spécialement, les animaux seront séparés du troupeau, mis au repos, et la plaie sera badigeonnée avec de la teinture d'iode.

Dans le cas d'inoculation à la queue, l'avantage est grand et le traitement ultérieur beaucoup plus simple, il suffit de sectionner la queue à quelques centimètres au-dessus de la pustule, avec les précautions de propreté ordinaire; cette section de la queue peut être faite sans inconvénient à partir du 15e jour. Dans le cas où quelques pustules à la queue seraient enflammées et si la queue devenait enflée sur une certaine longueur, il faudrait laisser les animaux au repos, badigeonner à la teinture d'iode et ne pas couper ces queues infectées.

Cette méthode de séro-clavelisation, employée déjà sur plus de 10,000 animaux à Arles, a donné d'excellents résultats.

Mortalité par clavelée .... 0.
— par accidents septicémiques tardifs.. 2 0/00.

Ces accidents seront facilement évités, si les précautions de propreté ci-dessus indiquées sont bien observées.

Formation des gîtes à larves d'"Anopheles"
en Algérie.

PAR LES Drs EDMOND ET ETIENNE SERGENT.

L'extermination des *Anopheles*, qui constitue, avec la défense mécanique des portes et des fenêtres et la désinfection du sang des paludéens par la quinine, un des modes de la prophylaxie du paludisme, nécessite, pour un pays donné, la connaissance précise et complète des collections d'eaux où vont pondre les femelles et où s'élèvent leurs larves.

Ayant visité à plusieurs reprises, et à tour de rôle, un certain nombre de localités palustres de l'Algérie, depuis le mois de mars jusqu'au moment de la pullulation des *Anopheles* et de l'éclosion des premiers cas de paludisme, nous avons pu ainsi nous rendre compte des conditions spéciales de la formation des gîtes à larves d'*Anopheles* en Algérie.

L'Algérie, comme on le sait, est traversée de l'est à l'ouest par une chaîne de montagnes, parallèle à la mer, l'Atlas qui, au nord, descend rapidement jusqu'au rivage. Ce versant septentrional, coupé de ravins et hérissé de massifs montagneux, constitue le Tell, qui couvre 14 millions d'hectares. Quelques grandes plaines s'étalent au milieu de ces contreforts escarpés : la Mitidja, la plaine du Chéliff, la plaine de Bône. Au sud, au contraire, l'Atlas se continue sans grands accidents de terrain avec les Hauts-Plateaux, surface de 11 millions d'hectares, à qui une altitude moyenne de plusieurs centaines de mètres et l'immensité d'espaces plats et dénudés donnent un climat assez rude. Les Hauts-Plateaux finissent où commence le Sahara sablonneux. Le Tell et les Hauts Plateaux, qui constituent l'Algérie proprement dite, sont donc des régions tout à fait différentes.

Dans le Tell, nous avons étudié plusieurs localités très palustres : dans la plaine de la Mitidja et dans le Sahel (chaîne de

collines qui sépare cette plaine de la mer), nous avons exploré Maison-Carrée, Oued-Smar, Maison-Blanche, la Rhégaïa, l'Alma, Gué-de-Constantine, Birtouta, Marengo, Montebello, Chéragas; dans le massif montagneux de la Kabylie, les gares de Thiers, Aomar-Dra-el-Mizan, Mirabeau, Ighzer-Amokran, Takrits-Seddouk; dans le Tell Constantinois, Condé-Smendou. Dans les Hauts-Plateaux du département de Constantine, nous avons fait les mêmes recherches aux Ouled-Rhamoun, au Khroubs et à Oued-Athménia.

Dans ces diverses localités, nous avons suivi pas à pas l'histoire de la formation des gîtes à larves d'*Anopheles*. De nos constatations, se dégagent les conclusions suivantes :

En Algérie, les larves d'*Anopheles* se développent :

1° Dans les marelles qui restent dans le lit desséché des oueds;

2° Dans les sources servant à l'alimentation des indigènes;

3° Dans les canaux, ou réservoirs artificiels, mal entretenus;

4° Dans les oueds à bords herbeux et à faible courant.

*
* *

I. — *Collections d'eau formées dans le lit desséché des oueds*. Le cours des oueds algériens est tout à fait inconstant (Oued Soummam, Oued Djemaa, Oued Isser, Oued Bougdoura, Oued Boudouaou, Oued Harrach). Dans un lit de sable ou de galets d'une largeur qui atteint parfois plusieurs centaines de mètres, le cours d'eau très réduit, qui subsiste en été (quand il subsiste), n'occupe pas invariablement chaque année la même place. Tantôt d'un côté, tantôt de l'autre de son lit, il laisse à sec une grande étendue de terrain, jamais la même chaque année. Les flaques d'eau, qui y persistent, sont très variables comme étendue, comme durée et comme position. Elles sont en général peu profondes et disparaissent dans le mois d'août. Mais elles ont, depuis les premières chaleurs, donné naissance à des myriades d'*Anopheles* qui détermineront l'éclosion des premiers cas de paludisme du mois de juillet. D'autres mares persistent tout l'été parce qu'elles sont entretenues par de petites sources à faible débit qui sourdent entre les galets (Oued Djemaa, près de la gare d'Aomar-Dra-el-Mizan; Ighzer Tazdéi, près de la gare de Takrits-Seddouk), ou qui sortent du sable fin (Oued Soummam,

près d'Ighzer-Amokran, Oued Harrach au Gué-de-Constantine). D'autres mares persistent une bonne partie de l'été parce qu'elles sont contenues dans une cuvette de même niveau que l'oued qui coule, très réduit, à côté (Oued Boudouaou, près de la gare de l'Alma), ou lorsque l'oued est complètement à sec, parce qu'elles sont situées sur une couche d'argile imperméable (Oued Chaaba, près de la gare d'Aomar-Dra-el-Mizan; Oued Delfa, près de la station de l'Oued Smar). Ces mares formées dans les lits des oueds ont une eau ordinairement assez pure : une végétation spéciale y croît (spirogyres), précédant la pullulation des *Anopheles*.

II. — *Dans les sources qui servent à l'alimentation des indigènes*, les *Anopheles* pondent de bonne heure, dès le mois d'avril (Thiers, Ighzer-Amokran) ou de mai (Chabet-es-Céid, près de Condé-Smendou). Ces sources ne reçoivent aucun soin des indigènes; toujours des mares de déversement séjournent en contre-bas et servent d'asile à des larves de Culicides (Mirabeau, gare des Ouled-Rhamoun, Chabet-es-Céid, Thiers). Mais la source elle-même est le gîte primitif des larves. Une végétation abondante croît sur ses bords (capillaires, etc.). De larges pierres, placées aux alentours, permettent d'y accéder sans mettre les pieds dans la vase. Généralement ces pierres n'ont pas été placées par les indigènes insouciants, mais datent des Romains, et l'on voit parfois à leur surface un creux formé depuis des siècles par la cruche qu'on y pose. Ainsi, en pays arabe, la source sans laquelle ne saurait exister une agglomération humaine est en même temps la cause indirecte d'insalubrité de la région, en servant de réceptacle aux larves d'*Anopheles*.

III. — Mais dans les localités que nous avons visitées, ce sont surtout *les canaux* et *les réservoirs d'eau* de toutes sortes que l'homme a construits, et qu'il a mal entretenus ensuite, qui fournissent les *Anopheles*.

Ce sont d'abord les *barrages* (Chéragas, la Rhégaïa). Leurs bords sont couverts de végétation aquatique donnant asile à des multitudes de larves d'*Anopheles*. Ce sont aussi les canaux dits *d'irrigation* (à l'Alma, l'Oued Smar, Maison-Blanche, aux Ouled-Rhamoun, au Val d'Or, près de l'Oued-Athménia, à l'Oued Terro, près de la gare de Birtouta). Ces canaux proviennent soit de barrages, soit de rivières; ils sont à courant très faible

ou nul. Ce sont souvent des lits artificiels aménagés pour des rivières qu'on a détournées de leur lit (Oued Terro, Oued Smar). A la gare des Ouled-Rhamoun, les gîtes exclusifs des larves d'*Anopheles* sont de petits *canaux de détournement* parallèles à de grands canaux d'irrigation à courant très rapide. Ces canaux de détournement servent à l'irrigation des prairies et des luzernières voisines. L'eau qui y séjourne dans l'intervalle de chaque irrigation provient d'infiltrations du grand canal voisin. Ces infiltrations sont causées par l'obturation incomplète, avec de la terre grossièrement tassée, des ouvertures créées dans la séparation entre les deux canaux au moment de l'irrigation. A la gare des Ouled-Rhamoun, ces petits canaux constituent les seules collections d'eau qui fournissent les *Anopheles* de la région, très nombreux dans toutes les habitations des employés de la gare.

Des trous d'eau, repaires de larves d'*Anopheles*, sont aménagés artificiellement autour des briqueteries. A Maison-Carrée, les mares creusées de main d'homme pour extraire la terre glaise fourmillent de larves d'*Anopheles*. L'insalubrité de la gare de Birtouta n'est due qu'à la présence de mares à eau constante situées à 170 mètres des habitations et qui ont été creusées anciennement dans le but d'extraire aussi de la terre glaise.

Enfin, des bassins où on laisse croître une végétation luxuriante, comme au jardin d'Essai, au Hamma près d'Alger, servent d'asile aux larves. En contre-bas du village de Thiers, un abreuvoir abandonné dans l'eau duquel croissent à l'aise les spirogyres, sert de repaire aux larves des *Anopheles* qui infestent le village.

IV. — *Oueds à bords herbeux, à faible courant.* Les *Anopheles* peuvent choisir comme lieu de ponte les bords des oueds, garnis d'herbes qui ralentissent le cours de l'eau. Dans l'Oued Boudouaou (à l'Alma), l'Oued Harrach (au Gué-de-Constantine), dans l'Oued Boutrik (à l'Oued-Smar), nous avons souvent recueilli des larves d'*Anopheles*. Mais lorsque le courant de l'oued est rapide, même en plein été (Oued Soummam, Oued Boumerzouk à la gare des Ouled-Rhamoun), et dépourvu d'herbes, jamais on n'y rencontre de larves d'*Anopheles*.



Distance à laquelle peuvent voler les Anopheles de leur lieu d'éclosion.

La distance séparant les mares à *Anopheles* des habitations dans lesquelles se rendent ces insectes une fois adultes est, en général, de 100 à 300 mètres. Il peut se trouver que cette distance soit plus courte : l'Oued Rhégaïa passe tout près du village même de la Rhégaïa. Certaines maisonnettes de la gare des Ouled-Rhamoun ne sont qu'à 40 mètres du canal infesté de larves. L'abreuvoir qui fournit les *Anopheles* du village de Thiers est à quelques mètres seulement des premières maisons. Sur le bord des oueds, on voit quelquefois des fermes imprudemment situées à 5 ou 6 mètres du lit où se forment les mares.

A la gare d'Ighzer-Amokran, nous avons pu observer que les *Anopheles* recueillis dans les chambres de cette gare provenaient de mares situées à un kilomètre. Cette gare est absolument isolée au milieu de la vallée de la Soummam : en juin, de nombreux adultes mâles et femelles d'*Anopheles* se trouvaient dans les habitations. Les environs de cette localité avaient été soigneusement examinés en avril et en mai ; aucune mare, aucune eau stagnante n'existait autour de la gare dans un rayon inférieur à 1,000 mètres, sauf la citerne de la gare, attenante aux habitations et où jamais nous ne recueillîmes aucune larve. A un kilomètre à l'est, se trouvaient des mares, dans le lit de l'Oued Soummam, mares renfermant des larves d'*Anopheles*. Le 19 juin seulement, les *Anopheles* adultes firent leur apparition dans les chambres de la gare. Ils provenaient sûrement de ces mares distantes d'un kilomètre. Il était à remarquer que ces insectes ne paraissaient pas avoir souffert d'un si long trajet, leurs ailes et leurs différents appendices étaient intacts, comme chez les insectes venant d'éclore.

***

Les dates d'apparition des premières jeunes larves d'Anopheles varient selon les différents climats :

Sur le littoral, au jardin d'Essai près d'Alger, nous avons pu recueillir des larves d'*Anopheles* tout l'hiver. Le climat humide et la température égale du bord de la mer permettent aux Culicides d'hiverner à l'état larvaire.

Dans la plaine de la Mitidja, les premières jeunes larves appa-

raissent dès le commencement de mai (Maison-Blanche, Marengo, Alma), en mars à la Rhégaïa.

Dans certaines localités de la Kabylie (Mirabeau, Takrits-Seddouk), les larves ne sont apparues qu'en juin. Dans 2 sources de la Kabylie (à Thiers et à Ighzer-Amokran), les larves se montrent dès le mois d'avril.

Sur les Hauts-Plateaux, l'apparition des larves se fait au mois de mai (Oued Athménia), ou seulement en juillet (canaux voisins de la gare des Ouled-Rahmoun). Dans cette dernière localité, nous visitâmes attentivement, en avril, mai, juin, toutes les collection d'eau avoisinant la gare, dans un rayon supérieur à un kilomètre. Nous ne pûmes recueillir aucune larve d'*Anopheles*. Le 3 juillet, de nombreux adultes femelles furent pris dans les chambres de la gare. C'étaient les femelles hivernantes qui, pour pondre, venaient se repaître de sang [1]. Aucune larve n'existait alors dans le voisinage. Ce ne fut que le 17 juillet que de très jeunes larves (3 millimètres de longueur) furent capturées dans un petit canal voisin, lequel avait été examiné avec soin à toutes les visites précédentes, sans succès.

***

Les moyens de s'opposer à la présence et au développement des larves d'*Anopheles*, dans les différentes sortes de gîtes que nous avons étudiés, différeront naturellement selon la nature de ces gîtes :

1° Les collections d'eau formées dans le lit desséché des oueds seront comblées; comme elles n'ont pas en général une très grande étendue, ce procédé sera facile et peu coûteux. Il faudra faire une surveillance exacte du lit de l'oued tout l'été. Lorsque ces mares sont entretenues par des sources, le comblement n'est pas praticable, il faudra verser du pétrole à leur surface ;

2° Les sources servant à l'alimentation seront captées, recouvertes en maçonnerie et on empêchera le développement de toute végétation aquatique ;

3° Les barrages seront débarrassés plusieurs fois par an des herbes qui croissent sur leurs bords, et seront pétrolés tous les 15 jours pendant la saison dangereuse. On pourrait y élever des poissons rouges destructeurs de larves, ce qui n'empêcherait

1. On sait que les *Anopheles* femelles ont besoin de sucer du sang pour que leurs organes génitaux internes fonctionnent.

pas de verser du pétrole à leur surface, ce dernier ne causant aucun dommage au poisson.

Les canaux dits d'irrigation seront récurés de la même façon et pétrolés. Il serait bon de leur faire un lit en maçonnerie, sur lequel la végétation aurait moins de facilité pour croître. Dans certains canaux des plaines ou des Hauts-Plateaux, dont l'eau est presque stagnante, des poissons rouges seraient d'une certaine utilité.

Les mares des briqueteries seront comblées ou nettoyées. Dans le cas de réservoirs mal entretenus, comme l'abreuvoir signalé au village de Thiers, l'autorité communale n'a qu'à ordonner des soins élémentaires de nettoyage;

4° Les bords herbeux des oueds algériens pourraient être endigués. En Sologne, dans le Loiret, une des causes ayant progressivement amélioré l'état d'insalubrité du pays est l'endiguement des rivières. Mais en Algérie, où les cours d'eau sont des torrents en hiver, comment proposer ces endiguements ? Quand il s'agit d'un lit comme celui de la Soummam, qui atteint 1 kilomètre de largeur en certains endroits, on ne peut songer à entreprendre ces travaux. Mais, dans certaines conditions, des travaux de ce genre seraient d'une utilité considérable. L'Oued Isser, près de Thiers, augmente tous les ans la largeur de son lit, laissant chaque été à découvert une zone dangereuse chaque fois plus grande. En quelques années, cet oued a forcé la route carrossable, primitivement parallèle à son cours, à faire un détour pour éviter son action destructive (entre Thiers et la gare de Dra-el-Mizan). Des vignobles, des plantations d'orangers ont été rongés. On voit, dans le lit même de l'oued, des orangers et des plants de vigne que l'impétuosité du torrent a fait descendre du talus bordant son cours. En creusant à l'oued Isser, en ce point, un nouveau lit endigué, loin du village, en l'empêchant de décrire des courbes, on améliorerait certainement les conditions hygiéniques de la région. Il y a ainsi un grand nombre de localités, où la régularisation du régime des oueds se trouverait servir les intérêts économiques en même temps que la prophylaxie du paludisme.

On voit qu'en résumé la suppression des *larves* d'*Anopheles* est praticable sur bien des points en Algérie. Elle doit naturellement constituer le procédé de choix, dans cette région.

REVUES ET ANALYSES

L'ALCOOL & SES DROITS NATURELS

I. — L'ALCOOL.

Préambule.

Je voudrais parler un peu de l'alcool, et le faire sans déclamation. Je voudrais dire ses droits, ceux qu'il tient de son existence, de sa nature et de ses propriétés. Je voudrais parler aussi de la façon dont on les respecte, ou plutôt dont on les méconnaît. Tout cela, s'il se peut, sans me brouiller avec personne. Cela m'est possible : je crois que je peux promettre de ne pas me fâcher. De plus, je suis seul ; je n'ai autour de moi ni public, ni école, ni disciples. Mes convictions théoriques sur la question sont tranquilles et perdent à se mélanger de passion. Je proteste d'un autre côté que je ne fais aucun commerce de vin ou d'eau-de-vie, que je n'ai nulle part une parcelle de vigne. Je ne suis ni un buveur ni un abstinent. Il n'y a donc, dans mon cas, rien qui incite, et qui m'oblige à être autre chose que clair; heureux si j'y réussis.

Ma besogne ne sera pourtant pas très facile, si j'en juge par les quelques douzaines d'aimables horions que j'ai déjà récoltés depuis que je suis entré dans ce champ bien gardé. Si je ne suis pas passionné, j'ai affaire à un public qui l'est d'ordinaire. Je ne parle pas seulement de ceux qui trouvent toujours la place bonne pour y loger un sermon, et qui ratiocinent. Je parle aussi de ceux qui raisonnent juste jusqu'au moment où ils découvrent que leur raisonnement va droit contre leurs intérêts ou leurs passions, ce qui les fâche. Il y en a à tous les étages. Voici l'État, par exemple. Il dresse bien l'oreille et s'inquiète lorsqu'on lui parle des dangers de l'alcool, de la dégénérescence de la race, de folie, de tuberculose. Mais proposez-lui de renoncer à

1. Extrait du *Siècle* et des *Annales de l'Institut Pasteur*, novembre 1903.

l'impôt qu'il tire de ce poison, et vous le verrez réfléchir. Le Parlemen apporte de son côté, toutes les fois qu'il discute ce sujet, les convictions du vent qui souffle, et il en fait une salade admirable. C'est lui qui a créé l'alcool de la nature et celui de l'industrie, l'alcool du Nord et celui du Midi, du grand et du petit bouilleur de cru, du riche et du pauvre. Le public, lui, se garde bien de laisser ses représentants en reste d'incohérence. Comme il n'a de responsabilité que vis-à-vis de lui-même, il fait ce qu'il veut, ou bien ce qu'il peut. Il ne se préoccupe guère de mettre sa conduite en rapport avec ses principes, car, au fond, il ne sait pas s'il a des principes. Mais il veut qu'on les respecte. Des ligues, qui pontifient, se créent pour cela. Il aime les boissons alcooliques; la preuve en est qu'il continue à les payer aux prix extravagants que leur fait l'impôt. Mais, malgré les prêches et les pontifes, cet amour ne l'a heureusement pas encore rendu intolérant, et, quand on est buveur, on a plus de chances de dîner en paix à côté d'un abstinent qu'avec un ennemi des juifs ou des congrégations.

Tous ces gens-là ne savent pas! Tâchons de leur dire des choses qu'ils comprennent, et où ils sentent cette part de vérité qui s'impose à tous. Un homme averti en vaut deux, dit le proverbe. Il en vaut encore bien plus quand c'est lui qui s'avertit lui-même. Mais comme la question de l'alcool n'est pas neuve, et a été beaucoup discutée, elle s'est beaucoup compliquée. Nous allons l'examiner sous ses différentes faces, et pour cela reprendre les choses de loin.

II. — RÉHABILITATION DE L'ALCOOL.

L'alcool est un aliment.

Je commencerai mon exposé en disant que l'alcool doit désormais être regardé comme un aliment, au même titre que l'amidon, la graisse et le beurre. Je ne saurais cacher le plaisir que j'ai à pouvoir parler ainsi. L'alcool a eu si longtemps une réputation douteuse. On lui savait bien gré du genre de plaisir qu'il donnait. Des centaines de poètes biberonnants, faisant rimer Vénus et Bacchus, célébraient bien ses mérites. Mais il y avait toujours quelque chose d'équivoque dans les hommages qu'on lui rendait, et encore aujourd'hui ceux qui avouent le vin n'avouent pas aussi facilement l'eau-de-vie. On dirait qu'il s'agit d'un commencement d'attentat à quelqu'un ou à quelque chose. Maintenant, pourtant, l'alcool peut s'avancer fièrement et dire : « Je ne suis pas seulement agréable : je suis utile. *Utile dulci!* Je suis peut-être l'ali-

ment qui possède au plus haut degré ce double caractère. Rendez-moi le rang et la considération dont vous m'avez injustement privé jusqu'ici ! »

Cette révolution de palais date de l'époque où MM. Atwater et Benedict se sont demandé sérieusement ce que c'était que l'alcool. Ils n'ont pas perdu leur temps en raisons démonstratives. Ils ont dit : l'alcool est un aliment, parce qu'il remplace très bien, dans la nourriture, des aliments authentiques, tels que le beurre ou l'amidon. Bien entendu, il ne faut pas aller chercher la viande comme terme de comparaison : la chair contient de l'azote. Mais la graisse n'en contient pas. Prenons donc trois jeunes gens bien portants ; habituons-les à un régime dans lequel entrent des aliments variés, à des doses telles que ce régime soit hygiénique, que le sujet n'engraisse ni ne maigrisse pendant la durée de l'expérience, qui est de plusieurs jours. A ce moment, supprimons dans ce régime le beurre et la graisse : remplaçons-les par de l'alcool, venant du vin ou de l'eau de-vie. Si cette substitution est faite de façon que la quantité d'alcool introduite dégage, dans un fourneau ou dans une lampe, autant de chaleur que le beurre ou l'huile supprimés, le sujet s'en apercevra bien à la saveur de ses aliments; mais son régime continuera à être hygiénique, et son poids restera stationnaire aussi longtemps qu'on le voudra. Il engraissera si on lui donne plus d'alcool que n'en comporte le barême; il pourra maigrir si on lui en donne moins. Bref, l'alcool se comportera avec lui comme un aliment non azoté quelconque, et la conclusion de l'expérience est d'autant plus amusante dans son imprévu que sur les trois sujets de M. Atwater, il y en avait deux qui, abstinents, ne connaissaient l'alcool que par les livres.

Je ne suis pas dans le secret des dieux ; mais je me figure volontiers que cette constatation a dû surprendre quelques-uns de ceux qui avaient déployé tant de talent pour la faire. MM. Atwater et Benedict travaillaient d'accord avec une Commission de savants et de *personnes influentes*, qui n'auraient pas été américaine si les questions d'alcoolisme avaient été absentes des préoccupations de tous. Si par hasard on allait trouver que cet alcool, condamné pour tant de crimes, était aussi condamné par la science et n'était pas un aliment ! Mais malgré cette préoccupation, dans la commission, le mot d'ordre était resté viril : « Cherchons la vérité. » Et on avait, en effet, cherché de façon telle, que cette enquête est une des plus belles œuvres du siècle. Quand il a fallu en publier les résultats, on ne peut pas dire que M. Atwater ait écrit un mot pour en atténuer ou en masquer la véritable signification scientifique. On sent pourtant qu'il a rencontré de la résistance, qu'il a dû subir souvent, dans des conférences, la *cross-examination* de quelque

farouche buveur d'eau, qu'il était, lui aussi, préoccupé de l'alcoolisme, et qu'il lui a fallu un certain courage, à lui et à sa commission, pour venir dire que tout l'argent attiré et dépensé dans cette sorte de croisade avait abouti à la victoire de l'ennemi.

Pourquoi l'alcool est un aliment.

Si net que soit ce triomphe expérimental, je ne voudrais déjà plus m'en contenter. Il ne suffit pas d'apprendre, il faut aussi comprendre. Que vient faire, dans ce qu'on pourrait appeler la règle d'Atwater, cette condition de quantités égales de chaleur dégagées par les quantités de divers aliments qui sont équivalentes? On comprend bien qu'elle soit faite pour régler l'appétit d'une machine à vapeur, et qu'une locomotive soit également satisfaite lorsqu'on lui sert des quantités de bois, ou de pétrole, ou d'alcool dégageant dans le même temps la même quantité de chaleur dans le foyer. Mais nous sommes un peu atteints dans notre dignité quand nous voyons que l'alcool se comporte dans notre estomac comme dans un fourneau d'automobile. Nous voudrions bien savoir pourquoi. Et il est certain que cette connaissance donnerait une assiette solide à toutes les déductions, encore un peu confuses, que nous avons à tirer de nos études sur l'alcool. Essayons de montrer que ce n'est pas un simple hasard qui l'a fait apparaître au rang des aliments, avec les caractères qu'il présente, qu'il y est à une place qu'aucun autre aliment ne peut prendre, et que, par suite, l'alcool n'est pas un aventurier, un rastaquouère cherchant fortune. C'est un des enfants de la famille, quelque chose comme le fils aîné. Mais la chose est délicate, et nous ferons bien d'insister.

Quand nous songeons à notre alimentation, à notre ventre, nous sommes les rois de la nature. Nous comptons avec elle comme si nous en avions fait le tour, avec pleine liberté dans notre choix d'aliments, laissant à nos organes le soin de se débrouiller au milieu de ce qu'on leur présente. La vérité est que, là comme partout, nous marchons guidés par des lisières et maintenus par la loi profonde des choses.

C'est une loi du monde que nous habitons, que la nourriture est faite par le soleil. Avec sa chaleur, avec les éléments de l'eau et de l'acide carbonique de l'air, les plantes édifient un peu de matière organique variée, qui, d'abord très simple de structure, soluble dans l'eau, se complique peu à peu, par apport d'éléments nouveaux, à la façon d'une dragée qui grossit. Apport de matière, apport de chaleur. Ils se font toute l'année sur la plante, sans que nous y fassions grande attention. Nous n'avons conscience de ce travail que lorsqu'il s'achève,

lorsque la floraison est terminée, et que la plante, qui a presque terminé sa croissance, commence à songer à l'an prochain en mûrissant ses fruits et ses graines. C'est alors que nous intervenons d'ordinaire, et que nous confisquons ces provisions pour nous.

Nous nous en croyons les maîtres : nous subissons, au contraire, les arrêts de leur destinée. C'est, en effet, encore une loi de notre monde que ces denrées, que nous avons récoltées ou moissonnées, ont été bâties sur un type commun, et faites des mêmes éléments diversement arrangés. Il y a partout de la cellulose, de l'amidon, du sucre, du gluten, de la caséine, et quand on y regarde de près, on constate que ces aliments parfaits sont presque une seule et même chose. Ils sont tous des sucres diversement déguisés. La nature s'est visiblement donné de la peine pour varier ses formes sous l'unité du fond. Elle a, par exemple, délicieusement joué avec l'azote, pour faire ses matières albuminoïdes, fondement essentiel de la vie. On est tout surpris de voir, quand on les étudie, que si ces corps contiennent dans leur molécule des éléments d'un autre type que le sucre, ce n'est qu'en faibles quantités, et que le plan général n'en est jamais masqué. Bref, les choses sont faites et bien faites pour nous faire illusion, mais nous ne sommes que des mangeurs de sucre.

Cette loi imprévue de notre alimentation nous en découvre à son son tour une autre. D'aussi vieux mangeurs de sucre, sous ses diverses formes, doivent être devenus du sucre, sous ses diverses formes. Notre sang et nos muscles sont du sucre. Notre cerveau, chargé de l'administration de nos idées, est du sucre. Nous ne savons pas, bien entendu, ce qui résulte de cela. Nous nous représentons volontiers que nous serions autres, de forme et de fonction, si nous étions bâtis sur un autre type, par exemple sur celui de la benzine ou de l'acide phénique. Mais on voit jusqu'où s'étend l'autorité de ces lois de nutrition. Nous n'en avons pas fini.

Ce sucre et les diverses formes élémentaires que nous avons énumérées ne sont peut-être pas des formes parfaites. Il faudrait avoir du fétichisme envers cet être inexistant, la nature, pour le croire. Elles sont seulement les formes les plus perfectionnées, les plus complexes que le végétal ait pu réaliser dans ses opérations de construction. Ce sont les plus beaux et les meilleurs produits du chantier ouvert chez tout être vivant. Mais il y en a d'autres, chez l'animal comme chez le végétal. Il y a ceux qui ne sont pas terminés et qui étaient en voie d'achèvement quand on a saisi le chantier. Il y a aussi ceux qui ont dépassé le maximum et qui commencent à descendre, parce que la plante vit d'eux, par conséquent les consomme, et qu'on ne peut vraiment pas l'empêcher de toucher à ce qu'elle a fait de meilleur pour les autres. La gourmandise est une qualité des plantes. A côté de ses

sucres, la plante fournira donc au consommateur des produits en train de devenir des sucres, et d'autres corps en voie de retour vers les matériaux initiaux de toute construction, l'eau et l'acide carbonique. Il y aura des substances non encore édifiées, et d'autres en voie de destruction. Or, une molécule de sucre pèse 180. Elle est faite de carbone, d'hydrogène et d'oxygène. Quand elle veut l'édifier ou la détruire, la nature ne peut pas faire ce qu'elle veut et opérer par infiniment petits. Ses moellons de carbone pèsent 12, ceux d'hydrogène 1, ceux d'oxygène 16. Généralement elle ne les ajoute pas ou ne les retranche pas un à un. Elle opère par groupes de deux ou trois, et cela gêne encore son travail d'architecte ou favorise son travail de démolisseur. Bref, on comprend que ces molécules incomplètes ou décomplétées de sucre soient peu nombreuses, qu'elles soient les mêmes pour la construction et la destruction, et qu'à la proposition simplicative : « C'est partout du sucre », nous puissions joindre celle-ci : « Ce sont toujours les mêmes produits peu nombreux de simplification du sucre. »

Ce qu'il y a d'amusant, quand on a chaussé une idée juste, c'est la facilité avec laquelle on marche. Notre raisonnement s'applique évidemment aux microbes, qui sont d'aussi admirables destructeurs de matières que les végétaux supérieurs en sont les merveilleux constructeurs. *Les produits de digestion sont donc aussi des produits de fermentation.* Voilà, résumés en dix mots, vingt ans d'effort et de travail. Pasteur y est tout entier, et nous retrouvons ici, droit sur ses jambes, et un peu ironique, l'alcool qui se dresse à son rang, juste à côté du sucre. L'alcool est un produit de la digestion des sucres, et n'est pas sûr de n'en pas consommer celui qui n'en boit pas. La nature semble nous poursuivre avec lui dans sa course vers l'amidon et les sucres, et dans la dégradation de ces produits. Elle nous crie : « Si tu n'en veux pas pour l'aller, tu en trouveras au retour. » Mais nous ne voulions pas la comprendre. Nous vivons pourtant de cette vérité !

Pourquoi l'alcool est un bon aliment

Nous aurons tout à l'heure l'occasion de dire à l'alcool quelques vérités moins à son avantage. Reconnaissons pour le moment que notre enquête, impartiale parce que scientifique. a tourné jusqu'ici en sa faveur. Il est impossible de lui dénier une part de la considération légitime que nous accordons à notre pain quotidien. Mais, comme tout à l'heure, je prétends encore à mieux pour lui. Je prétends que du moment où il est aliment, matière d'un travail de digestion, il n'y en a pas en mesure de lui disputer le premier rang, comme puissance nutritive, et qu'il dépasse même les sucres sous ce rapport.

Pour nous en convaincre, étudions la plus connue de ces séries de produits alimentaires que les plantes fabriquent, soit pour nourrir les autres, soit pour se nourrir elles-mêmes, avec une abondance et une régularité qui sont le privilège des usines bien engrenées. En tête de la série, nous trouvons d'abord la substance que la nature a élevée au plus haut degré d'organisation : c'est la cellulose, depuis celle du bois à brûler jusqu'à celle de la salade, qui forme en quelque sorte le squelette de la plante. Puis vient la fécule ou l'amidon, dont le caractère nutritif est déjà plus apparent. De l'amidon, le brasseur tire d'abord de la dextrine, puis des sucres divers, maltose et glucose. Ceux-ci à leur tour fournissent de l'alcool. Au delà, la série se poursuit, plus confuse, avec des corps dont la molécule se simplifie de plus en plus, comme les acides fixes et volatils, les aldéhydes, jusqu'à ce qu'on retrouve le point de départ, l'eau et l'acide carbonique.

C'est le même chemin que la plante parcourt en sens inverse quand elle construit. Elle accumule dans ces produits de plus en plus de chaleur solaire en commençant par les aldéhydes, en finissant par la cellulose du bois, qui contient le plus de soleil, et devient un moyen de chauffage. De même à chacun des autres produits correspondent des quantités de chaleur graduellement croissantes. Il suffit, pour retrouver ces chaleurs de combustion, d'en brûler un certain poids dans un fourneau quelconque. Dans le cas des aliments, l'organisme est ce fourneau, et c'est là la démonstration faite par Atwater que la valeur d'un aliment se chiffre par sa valeur de combustion.

Arrivés à cette conclusion, nous pouvons nous demander quelles sont les transformations digestives les plus puissantes, celles qui fournissent le plus de chaleur. On voit tout de suite ceci. La digestion commence par des actes très peu calorifiques. La dégradation qui passe par les termes amidon, dextrine, et même sucre, est à peine apparente au point de vue thermique, et les chimistes ne seront pas surpris d'apprendre ce fait, car ils savent que toutes ces transformations se réalisent par l'adjonction de quelques molécules d'eau, sans intervention d'oxygène. La production de chaleur et la perte calorifique ne sont un peu sensibles que dans l'acte suivant, la transformation du sucre en alcool et en acide carbonique. Ici il y a eu combustion, comme l'a dit Lavoisier, d'une partie du sucre aux dépens de l'autre. Finalement, toutes les transformations que nous venons de passer en revue ne dégagent que le dixième de la chaleur totale enfermée chez l'aliment, les neuf autres dixièmes restant précieusement en réserve pour la combustion de l'alcool et des autres produits plus rares, qui conduisent à l'acide carbonique. Il n'est pas douteux que toute cette pyrotechnie de la digestion ne se tire autour de l'alcool comme pièce de bouquet, œuvre essentielle d'une opération dans

laquelle les physiologistes la dédaignaient et ne lui laissaient aucune place.

C'est qu'ici l'oxygène est entré comme acteur. Tandis que, tout à l'heure, les agents de transformation de la matière alimentaire, les liquides digestifs, étaient surtout sécrétés dans le canal intestinal, où ils opéraient à l'abri de l'air, ceux qui interviennent maintenant, à partir de celui qui dédouble le sucre, fonctionnent en présence de l'air contenu dans le sang et les tissus. La digestion ne se fait plus dans le canal digestif, elle se fait partout. La pièce a changé de théâtre, et peut se jouer à la fois sur tous les points du corps. Les acteurs n'ont pas besoin de se presser, ils sont plus nombreux, et la quantité totale de matière mise en mouvement augmente. Et c'est ainsi que l'un aidant l'autre, sans qu'il y ait nulle part, dans les intestins ou les tissus, d'élévation de température bien sensible qui témoigne d'un déséquilibre, les choses vont pendant des années. C'est la régularité des bonnes montres, qui marchent avec le repas d'un tour de clef par jour.

Et le côté piquant de la chose, c'est que nous ne savons tout cela que depuis hier ou avant-hier. Nous avons fait des livres dans lesquels il était parlé de la construction de l'aliment par la plante, de la destruction de l'aliment par les microbes ou les animaux, des théories de la digestion, et tout ce qu'il y a d'essentiel dans la digestion nous avait échappé. Nous ne connaissions guère que le dixième des transformations qui y prennent place, celles qui roulent autour de l'apparition ou des disparitions de la cellulose, de l'amidon, des sucres. Nous ignorions presque toute l'histoire de l'alcool, et nous parlions! Cette idée peut amuser. Il ne faut pourtant en tirer que ceci : Continuons à chercher, puisque ça nous réussit.

L'ALCOOLISME

Pourquoi l'alcool est un très bon aliment

Je me suis jusqu'ici bien plus préoccupé de la place qu'il faut donner à l'alcool parmi nos aliments physiologiques que je ne l'ai étudié en lui-même. Mais je serais bien étonné si mon lecteur rapportait de ce qu'il vient d'apprendre une autre impression que celle-ci, c'est que l'alcool est fait pour lui ou lui pour l'alcool, ce qui est au fond la même chose. Je ne crie pas haro sur le sucre, le pain, la viande, je ne suis pas ingrat : je dis seulement qu'à côté de la viande, il y a du bouillon, et que l'alcool est une sorte de bouillon préparé avec

une dilection évidente. Le sucre met presque de l'empressement à fermenter, et le premier vin a été fait par une génération tout aussi spontanée que ceux qui lui ont succédé. De la levure y a apparu, y apportant la cause de la dislocation du sucre. De plus, la matière qui fabrique l'alcool et le verse dans nos tissus a de la peine à en faire autant que les tissus en demandent. Enfin, et c'est surtout sur ce point que je voudrais insister, si le sucre est un aliment supérieur à l'amidon, l'alcool est supérieur au sucre.

Pourquoi supérieur ? Rassurez-vous ! je ne vais pas réveiller un débat sur une question de goût. Nous nous sommes trop bien trouvés jusqu'ici d'avoir, dans notre exposé, écarté les prédilections individuelles. Je dis que l'alcool est préférable au sucre, parce que sous le même poids il contient plus d'aliment.

Quand un poids de 100 grammes de sucre fermente, il donne environ 50 grammes d'alcool et 50 grammes d'acide carbonique (arrondissons les chiffres !). L'acide va dans l'air ; il est perdu pour nous. Tout ce qu'il faut remarquer chez lui est qu'en s'en allant il n'emporte pas de force. Il ne peut pas fournir de chaleur, il est brûlé, il n'a aucune qualité d'aliment. C'est du poids mort. L'alcool en est débarrassé, et vaut davantage, puisqu'il contient, sous un poids plus faible, la totalité de la chaleur ou de la valeur alimentaire du sucre dont il provient. Disons que, comme matière alimentaire, l'alcool vaut environ deux fois son poids de sucre. La bonne volonté de la nature envers ce protégé est évidente et apparaît surtout quand on sait qu'elle en a fait l'aliment qui contient le plus de puissance sous le moins de masse. L'aldéhyde et l'acide acétique, qui le suivent dans la série chimique, lui sont très inférieurs au point de vue calorique et sont de médiocres aliments, de sorte qu'on pourrait dire, en forçant un peu, que l'alcool est la seule forme alimentaire non azotée voulue par la nature.

Au reste, voici le moment où les qualités qu'il acquiert ont été remarquées par l'homme, qui tout naturellement en a abusé et en a fait des défauts. Les boissons alcooliques sont facilement absorbées par l'estomac. Il en résulte une petite excitation qui est aimable et invite à renouveler. Allons-nous en vouloir à la nature qui a rendu agréable ce qui est utile? Si on continue, on est averti par de nombreux symptômes, sur lesquels personne ne se méprend, qu'il faut prendre garde, car on n'accusera pas la nature de n'avoir pas mis de garde-fous le long des pentes dangereuses. Elle vous dit, par toutes ses voix, que si elle aime l'alcool, elle veut qu'il soit toujours amené avec lenteur au contact des cellules.

Si on méprise ses avis, ce sont les désordres de l'ivrognerie et de l'alcoolisme. J'en ai vu des milliers de tableaux. Je n'en tracerai pas un de plus.

Je prie qu'on croie que ce n'est pas par indifférence. J'ai écrit sur ce point, dans mon *Hygiène sociale*, un chapitre auquel je n'ai rien à ajouter. Je crois encore que le penchant naturel de l'homme pour l'alcool est un des plus dangereux et des plus urgents à combattre. Seulement, je suis stupéfait des moyens employés pour en triompher.

Tout ce qu'on a dit et écrit sur ce sujet a de vagues aspects de prône philosophique ou religieux, caractérisé, comme le sont presque tous les sermons, par l'impersonnalité et l'indifférence. On est condamné à se répéter. De raisons, je ne trouve et, en effet, ne peux trouver que celle-ci : c'est que l'homme est un être faible, et malheureux, et crédule, qu'il faut l'aimer, et le plaindre, et le protéger. Mais faut-il l'aimer et le plaindre assez pour lui raconter les bourdes qu'on lui débite sur l'alcool ? Pensez-vous qu'il soit indigne de la vérité ? Disons-la, au contraire, disons-la le plus possible, et surtout le plus clairement possible. Nous verrons où la foule ira, malgré les prêches officiels et officieux.

Nous avons dit : l'alcool est bon, et nous l'avons prouvé. Nous avons dit ensuite : l'alcool est très bon, et nous avons donné nos raisons. Nous disons maintenant l'alcool est trop bon, et de ce fait il a appelé autour de lui le travail de l'homme. La bonne nature nous avait laissés à la boisson alcoolique étendue, et on s'enivrait. Témoin Noé. Voilà que l'art prestigieux de Nicolas Flamel et de Raymond Lulle s'en mêle : et nous avons l'alcool. En ajoutant à l'alcool qu'on distille des plantes à essences odoriférantes, on a les liqueurs, les élixirs et tout l'arsenal de l'alcoolisme. Je laisse de côté, pour le moment, comme ne se rapportant à notre sujet, toutes les industries variées ayant l'alcool pour base. Je me place seulement en présence des liqueurs, et je me dis : vaut-il mieux qu'elles existent, avec tous leurs défauts, ou qu'elles n'existent pas ?

Car leurs farouches contempteurs sont des iconoclastes. Bons pères, bons époux, bons citoyens (meilleurs, en moyenne, sûrement, que la moyenne des hommes), ils sont volontiers intransigeants sur ce point. Pas de vin, disent-ils ; l'eau vaut mieux. Pas d'alcools, ils sont tous dangereux. Pas de boissons à essences, elles sont meurtrières. Puissions-nous voir toutes les usines et les magasins de ces produits flamber dans des punchs gigantesques !

Nous seuls en être cause, et mourir de plaisir!

C'est bien beau dans Corneille. Ça l'est moins quand on n'a en face de soi que son encrier.

Ce qu'il y a de curieux, c'est que les médecins sont les plus combatifs. Ils ont failli faire réussir une conspiration contre le vin, en le proscrivant au chevet du malade, puis dans le ménage de l'homme bien

portant. Ils semblent s'être très vite aperçus qu'ils n'avaient aucune raison pour cela, et renoncent gentiment à cette croisade un peu étourdie. Mais ils se tiennent ferme sur leurs fameux principes à propos des autres boissons. Voyons où s'arrêtent leurs droits de conseillers maîtres.

Croisades du Passé.

Il n'est pas facile à un laïque de discuter avec un médecin. C'est comme avec un député qui vous répond : Ça, c'est de la politique. Il faut s'incliner. Je m'inclinerai donc. Quand on me dira : C'est un typhoïque, c'est un alcoolique, je dirai aussi, c'est un typhoïque, c'est un alcoolique. Si on me dit d'une cirrhose hypertrophique du foie qu'elle est d'origine alcoolique, je ne le croirai qu'à moitié, parce que s'il y en a qui affirment, il y en a qui nient, et un plus grand nombre qui ne nient ou n'affirment. Ce sont des médecins : ils ont le droit de parler. Moi, je n'ai que celui de me taire. Mais si on vient me dire : la statistique nous apprend que les alcooliques sont très nombreux parmi les malheureux qui succombent à des morsures rabiques; comme ils ne sont pas alcooliques depuis qu'ils ont été mordus, l'alcoolisme prédispose à mourir de la rage. Ici, mon droit reparaît, et je fuirai volontiers cette sorte de raisonnement ; je vois trop mal la relation entre la prémisse et les conséquences.

Je dois avouer que je ne l'attribue à aucun médecin. Mais tous n'en font-ils pas un de pareil avec la tuberculose ? Qu'est-ce, sauf parler à l'imagination pour l'effaroucher, que de dire : l'alcoolisme et la tuberculose s'accompagnent et vont de pair, quand on sait que tous les cas d'alcoolisme du monde ne pourraient donner un bacille tuberculeux, et qu'il n'y a aucun rapport entre les maladies. Dites, si vous voulez, et alors je vous donnerai complètement raison, qu'un alcoolique, plongé dans un milieu ouvert à la tuberculose, deviendra plus facilement tuberculeux, parce qu'il est affaibli, ne se soigne pas et n'a quelquefois pas d'argent pour le faire. Dites encore, parce que c'est encore vrai, qu'un poitrinaire, emprunté à un milieu de contagion alcoolique, deviendra plus aisément le buveur invétéré que vous nous dépeignez. Ajoutez, car c'est encore vrai, qu'il en est de même pour la syphilis, les maladies des fumeurs d'opium, et, en général, pour toutes les maladies qui tendent à emporter leur homme. Et alors, nous nous entendrons, et nous dirons que l'alcoolisme est une déchéance nouvelle, qui superpose ses effets à ceux des autres, et qui doit être traitée pour elle-même, et sans tenir compte de toute la rhétorique déposée à ses pieds.

Ce qui nous reste à savoir à son sujet, ce n'est pas la littérature,

pas même la littérature médicale qui nous le dira. C'est l'histoire de l'enivrement, faite en partant de la notion d'aliment, et non pas de poison, comme on l'a fait jusqu'ici. Pour tous les autres aliments, l'excès est suivi de la fatigue des organes, parfois même de quelques désordres sans gravité. Tout ce que nous avons appris sur ce point accuse chaque jour davantage la réalité de cette notion, d'après laquelle toute digestion, soit par la faute de l'organisme, soit surtout par la faute des microbes du canal intestinal, est une partie à jouer, quelquefois difficile. Mais d'ordinaire les aliments passent bien, et l'alcool aussi, lorsqu'il n'est pas trop abondant. Comme règle que j'ai trouvée juste toutes les fois que je l'ai cherché, tout homme qui sent le vin ou l'alcool une heure au plus après qu'il a bu, boit trop; il fera bien de se surveiller.

Mais comment se fait-il que toutes les cellules auxquelles touche l'alcool, lorsqu'il dépasse la mesure, arrivent à s'accoutumer à son contact, et en demandent des doses croissantes? A quoi correspond cette accoutumance fâcheuse pour un aliment tel que lui? Est-ce un commencement de déchéance? Voilà des questions physiologiques, ou même pathologiques, d'un autre intérêt pour le traitement de l'alcoolisme que celle de ses relations avec la tuberculose et la syphilis. Après quoi je dirai encore que tout cela n'est encore rien, et qu'il faudra bien s'occuper du problème moral, qui est au fond de la question.

Ici ce ne sont plus les médecins qui sont en scène : c'est nous-mêmes. Il y a longtemps en effet que ce problème de l'alcoolisme nouspréoccupe tous, et nous avons traduit notre effort de façons diverses. Les pouvoirs publics sont même intervenus.

« Qu'à cela ne tienne! a dit d'abord l'Etat. Nous allons mettre deux lignes de plus dans un programme d'études primaires déjà chargé, et nous prierons nos instituteurs de les développer avec tout ce qu'ils pourront y mettre d'âme. Nous allons de même, au moyen d'un article nouveau, demander à nos professeurs de philosophie, de philosopher, c'est-à-dire de faire là-dessus un petit développement éloquent. En plus, nous demanderons aux candidats bacheliers ce qu'il pensent de l'alcool, et vous verrez quelle unanimité! Avec cela, et les ligues anti-alcooliques, si raisonnables, que je vais essayer de faire prospérer, moi État, par les moyens qui me sont propres : décorations et prix, nous allons créer un grand mouvement dont vous verrez la puissance. »

Je plaisante, et en demande pardon à qui de droit, spécialement à ceux qui se sont jetés dans la tourmente, et parmi lesquels il y a tant de belles et bonnes âmes qu'on a toujours chagrin à contrister. Mais, quelque regret que j'y aie, je crois devoir leur dire pourquoi ils *doivent* échouer. *Amicus Plato, sed magis amica veritas.*

Croisades de l'avenir.

C'est que la question a changé de face le jour où l'alcool nous est apparu comme un aliment ordinaire, ayant ses qualités et ses défauts. Il est quelqu'un. On n'a plus le droit de le traiter uniquement comme un agent de plaisir. Du moment qu'il est utile, il représente une part de la fortune du pays, non la moindre, car il y a plus de deux millions d'hectares de sol français plantés et replantés en vignes et ils nourrissent plusieurs millions d'habitants. Je ne parle pas du cidre, ni de la bière, ni des planteurs de betteraves, dont l'alcool est particulièrement maudit, tellement que c'est parfois autour de lui seul que se fait la campagne. Qu'arriverait-il si elle aboutissait? A-t-on le droit d'encourager des prédicants dont le succès serait si funeste, et au milieu de leur courage à recommander aux autres des pratiques qu'ils n'ont pas toujours, que d'autres fois ils s'imposent (car il y en a de tous), n'ont-ils jamais pensé qu'il pouvait sortir un peu de mal du bien qu'ils veulent faire?

Vraiment, j'ai quelque regret à parler ainsi aux braves gens des ligues antialcooliques, car ce sont tous de braves gens. Emus par ce qu'ils ont pris pour un intérêt public, mis en présence des périls de l'alcoolisme, ils se sont imposé des devoirs, des devoirs humbles, mais journaliers, et impliquant une continue possession de soi-même. Et de cela il faut les louer hautement, car c'est partout chose rare. Ils se sont dit : « Tâchons que nos amis ne s'habituent pas à l'alcool. On se libère plus facilement d'un pli qu'on n'a pas pris, » et ce sentiment d'affectueuse solidarité est des plus respectables. Plaise à Dieu que notre vie sociale s'imbibe de plus en plus de sentiments tout pareils! « Prenez garde, leur dirai-je à mon tour, de réussir trop bien, et de n'arriver qu'à découvrir Pierre pour couvrir Paul. Vous n'avez au fond rien à dire contre l'alcool, et rien, dans votre pauvre façon de concevoir la vérité, ne vous autorise à aborder le rôle de Providence, surtout quand c'est pour dire que c'est l'alcool qui a tort, et qu'il faut le supprimer avec ceux qui le produisent. »

Si, en restant fidèles à cet ensemble d'idées, nous nous tournons du côté de l'État, nous aurons peut-être quelque chose à ajouter. Son enseignement antialcoolique officiel a été une erreur, parce qu'il n'avait pas de base scientifique, et que nulle part le mensonge banal des programmes n'était plus évident. Nous sommes élevés comme s'il n'y avait que des mots et pas de faits. Or, ici, c'était un enseignement de mots trahis par les faits. L'État se montrait propriétaire de convictions qu'interprétaient sans doute très bien ses professeurs de

divers ordres, mais qu'interprétaient tout autrement ses collecteurs d'impôts, bien plus attentifs à l'extension de la fabrication et de la vente qu'à toute autre considération ; c'était là le fait qui ridiculisait les tirades.

Cet enseignement en l'air ne me semble plus possible. Mais il y en a peut-être un autre qui pourrait parler ainsi :

L'alcool est un aliment. Il l'est comme le sucre, à un niveau plus élevé que lui, à un niveau tel qu'une partie d'alcool représente deux parties de sucre. C'est un aliment très perfectionné par les lois naturelles qui le fournissent. Le goût que l'homme a toujours montré pour lui, et qui plaide en sa faveur, a fait qu'on a cherché à le perfectionner davantage. A peu près inoffensif et généreux dans le vin, il a fini par être, dans les liqueurs et les alcools d'industrie, d'abord excitant, puis dangereux. Il avertit lui-même du péril croissant ; il commence par enivrer l'homme et finit par l'abêtir. Un sommeil de brute termine la scène.

Il est bon de ne jamais aller jusque-là. Quand, au contraire, on recommence et qu'on prend une habitude, c'est une véritable maladie qui commence ; maladie de la volonté d'abord, maladie des organes ensuite, qui se superpose aux autres maladies dont l'alcoolique peut être atteint. La tuberculose, les maladies du système nerveux, la folie sont les plus fréquentes.

L'existence de ces dangers n'empêche pas l'usage de l'alcool. Il est déraisonnable de se tenir dans la zone dangereuse ; il est raisonnable de se tenir dans la zone où l'alcool est un bienfait. Quand on se rapporte au vin pour se faire un type de la première zone, aux alcools impurs comme type de la seconde, la marge est assez grande pour qu'on ne puisse se tromper, et accuser la nature de nous tendre des pièges. Pratiquement, la zone inoffensive est celle dans laquelle toute trace d'odeur alcoolique a disparu de la respiration du buveur une heure après le repas. Cette zone correspond environ, pour l'homme moyen, à un litre de vin par jour, ou bien à la quantité correspondante d'eau-de-vie.

Une autre règle rend service : *Même dans les limites indiquées, usez, mais n'abusez pas.*

Voilà ce qu'on pourrait appeler la partie scientifique de l'enseignement que l'Etat pourra donner où il voudra. Elle ne prête pas à rire : elle *se tient*. Elle a un autre avantage, L'Etat pourra y souder le secret de son intervention. Il est accepté que l'alcool, devenant une denrée utile, ne peut pas se passer du concours de l'Etat dans son commerce. Peut-être serait-il possible d'élever un doute sur la légitimité de cette

conclusion. Mais l'État n'en a aucun. En ce moment il rêve sur l'alcool. Il se demande même s'il ne serait pas utile d'en être le seul propriétaire. S'il y parvient, il sera dans une situation réjouissante, au cas où il poursuivrait encore l'enseignement qu'il donne aujourd'hui. Si l'alcool est cette vilaine chose qu'on nous dépeint, quelle autre conclusion d'une conférence que celle-ci : foin de l'alcool et sus au monopole! L'État ne peut laisser durer cette contradiction entre ce qu'il dit et ce qu'il fait.

Il redevient logique avec les idées nouvelles. L'alcool est bon et mauvais, utile et nuisible, aliment ou poison, et voilà justifiée l'intervention du gouvernement quand on le manipule et quand on le débite. Nous avons pris notre parti à son sujet, et savons bien qu'il est et qu'il restera matière à impôt; mais nous n'aurions rien à dire si cet impôt tient compte de toutes ses qualités ou de ses vices. C'est seulement alors qu'il sera légitime, en obéissant à la logique de son origine.

On voit ici apparaître une deuxième question que nous n'avons pas encore abordée, c'est la loi de l'impôt. Nous allons entreprendre son étude.

LES VINS

Leur histoire philosophique

Jusqu'ici, je n'ai parlé de l'alcool que comme du composé chimique qui caractérise les boissons alcooliques, et leur donne ce qu'elles peuvent avoir de qualités, suivant les uns, de défauts suivant les autres. Je ne me suis pas préoccupé de l'alcool comme matière de commerce ni comme matière d'impôt. Que vaut-il, financièrement, par comparaison avec ceux des aliments de son espèce dont la valeur est acceptée de tous, la graisse, le beurre, le sucre, l'amidon? Et que vaut-il au regard de l'impôt ? Peut-on continuer à le charger, sous prétexte qu'il donne l'argent dont on a besoin, et qui rentre pour ainsi dire tout seul, grâce à la puissante administration des contributions indirectes? Doit-on ne lui tenir aucun compte de ses qualités alimentaires, et faut-il le traiter en paria, par rapport, par exemple, avec le sucre et le beurre? D'une manière plus générale, quels sont ses défauts et ses qualités au point de vue de l'impôt? Est-il de ces denrées qui en portent facilement le poids, ou bien de celles qui fléchissent, ou bien encore qui y échappent avec allégresse,

tant la chose est simple et parfois élégante, comme un ressort qui se détend ?

Voilà quelques-unes des questions que nous sommes conduits à nous poser. Je dis quelques-unes, parce que si on voulait entrer dans le fourré de la législation relative aux alcools, nous n'en sortirions pas. J'ai perdu un mois à étudier cette législation. Pour le moment, je la crois folle. Mais comme je ne veux me brouiller avec personne, je me hâte de dire que je serais très heureux de me tromper. Contentons-nous de plaindre ceux qui l'appliquent, et qui passent leur vie à tenir compte des distinctions infinies, des si, des car et des mais de l'administration. Maintenant surtout que voilà l'alcool industriel qui entre en régie (et je suis heureux de penser que je n'ai rien à en dire : je ne parle pas de l'alcool aliment des automobiles) avec ce nouveau client qui a provoqué la naissance d'un second client nouveau, l'alcool dénaturé, les problèmes que se posent les employés sont presque des problèmes scientifiques, et on envisage sans peine une situation dans laquelle des multitudes de chimistes du commerce ou de l'industrie passeraient leur temps à *coller* les chimistes de la Régie, à charge de revanche. Bel emploi des forces humaines !

Forcés de nous borner, nous nous en tiendrons aux questions capitales que nous venons de noter. J'espère que personne ne niera leur importance ; j'espère qu'aucun de ceux qui m'ont fait l'honneur de me suivre jusqu'ici n'hésitera sur le sens général de ma solution, c'est qu'il y a à prendre au sujet de l'alcool presque exactement le contre-pied de ce qu'on a fait jusqu'ci. Je dirais volontiers, si l'extrême concision ne nuisait pas toujours à l'absolue justesse, que le mot d'ordre de notre effort doit être la suppression de l'Administration des contributions indirectes et de ses préoccupations d'aujourd'hui. Il va sans dire que ce que je souhaite est bien plus un changement dans l'esprit qu'un changement dans les hommes.

Ici, je sens bien que, malgré toute ma prudence, je vais effaroucher certaines personnes en posant ainsi la question. Qu'on me permette de rappeler ceci : Il y a eu une époque où une contribution indirecte, celle du sel, pesait sur la conscience publique autant et plus que celle de l'alcool aujourd'hui. L'État en avait même le monopole, et il en était arrivé jusqu'à fixer la ration de chaque consommateur. Le sel était surveillé jalousement au départ, accompagné en route par la gabelle armée, et les rencontres avec les faux sauniers n'étaient pas rares. Alors, comme aujourd'hui, tous les employés agissaient dans la plénitude de leur droit, mais la mesure était devenue comble. Cette administration tracassière et parfois meurtrière a disparu. Ceux de ma génération en ont vu les derniers fantômes, et elle a fini vilainement, petitement. Elle est morte de son monopole, dans l'impossibilité d'y

renoncer, car elle y trouvait de l'argent, et dans l'impossibilité de le gérer, car comment le faire vivre sans rationner arbitrairement bêtes et gens. Disons même, car cela est plus vrai et plus haut, qu'elle a succombé en présence des progrès de la raison humaine, guidée par les encyclopédistes, et qu'elle a été, sans le vouloir, avec l'essai du *trust* des blés d'alors, un des facteurs de l'état d'esprit révolutionnaire. Si je démontre que l'alcool est encore plus indiscipliné que le sel, qu'il est au moins aussi utile et agréable, et qu'il reste soumis aux mêmes lois absurdes et aux mêmes vexations arbitraires que le sel il y a cent ans, ceux qui s'effarouchent à l'idée d'une administration qui change de doctrine préfèrent-ils cette autre idée d'une administration qu'on jette à terre parce qu'elle n'a pas su se rénover, ou d'un parlement qui s'effondre, parce qu'il a perdu le sens des aiguillages. Ce n'est pas que ceux d'alors avaient mauvaise volonté : c'est qu'ils ne savaient pas. Voilà ce que montre à merveille une petite histoire philosophique du vin, la meilleure des boissons alcooliques.

Le vin ne vaut pas seulement par son alcool, dont il contient une moyenne de 8 à 10 0/0 en volume. Il y a d'autres éléments utiles : la glycérine, 3 à 4 grammes par litre, qui est brûlée, par conséquent sert ; de l'acide tartrique, aliment très utile et assez rare, qui existe à l'état de crème de tartre; d'autres acides fixes et volatils, en faible quantité; un peu de matière extractive, mal connue. Je fais abstraction de tous ces éléments, et ne compte que l'alcool. Un litre de vin à 10 degrés contient 80 grammes d'alcool. D'après ce que nous avons vu, 4 parties d'alcool ont à peu près la même puissance calorifique et nutritive que 8 parties de sucre. Le chiffre exact est 7. Cela nous fait 140 grammes de sucre pour l'équivalent, au point de vue alimentaire, des 80 grammes d'alcool contenus dans notre litre de vin à 10 degrés. Ce n'est pas se montrer excessif que d'évaluer à 40 centimes le prix de ce vin. C'est à peu près le prix d'achat de cette année pour les adjudications de l'Assistance publique. Pour obtenir la même quantité de force, nous avons donc à dépenser, dans un cas, quarante centimes de vin, et dans un autre, dix centimes de sucre. La disproportion est évidente.

Cherchons un terme de comparaison dans une autre direction, par exemple du côté des corps gras. Ici le beurre ou l'huile donnent, à poids égal, plus de chaleur que l'alcool, et pour remplacer les 80 grammes de cette substance contenus dans un litre de vin à 40 centimes, il nous faut seulement 60 grammes de corps gras, les trois quarts. En les empruntant au beurre à 4 francs le kilo, c'est 0 fr. 25. En les prenant à l'huile à 1 franc le litre, cela fait un peu plus de 5 centimes.

La disproportion serait encore plus marquée si nous avions comparé avec les féculents, bien que ce soit ici l'inverse de ce qui se pro-

duit avec les corps gras, et qu'il faille, comme pour les sucres, environ 7 de féculents pour remplacer 4 d'alcool. On retrouve les prix trouvés pour l'huile : 5 centimes environ.

J'ai l'air de me tenir dans le monde des babioles, et je concède volontiers que le bourgeois ignore ou dédaigne ces questions. Mais la paysanne ou la femme de l'ouvrier, qui achète au jour le jour son sucre et son vin, puise dans ses débours perpétuels un sentiment très net non seulement du prix des choses, mais encore de leur valeur proportionnelle. Elle évalue les économies qu'elle fait par suite des diminutions de taxe, qu'elle appelle, sans y songer, des diminutions de droits, et des réflexions qu'elle a pu faire, tant à propos des vins qu'à propos des sucres, la République a bénéficié plus qu'on ne pense. Mais elle n'en reste pas moins attentive à l'emploi qu'elle peut faire de ces économies. Va-t-elle acheter un litre de vin, ou se donner pour le même prix 600 grammes de sucre, de quoi sucrer 60 fois son café?

C'est là qu'elle est bonne à regarder. Pas d'alcool, du sucre, lui crient aux oreilles les tempérants! Il y a de ce côté des économies de bourse et des économies de santé! Pas d'alcool ni de sucre, des pommes de terre, encore plus économiques, crie d'un autre côté parfois la nécessité. Un peu de tout cela, dit la ménagère sensée ; mais c'est égal, proportionnellement, le vin est bien cher! Comment faisait-on, il n'y a pas longtemps, lorsqu'il était grevé de droits égaux à la moitié et plus de sa valeur?

Car notre histoire est philosophique, c'est-à-dire abrégée et rapide. Nous n'en sommes pas moins arrivés aux impôts de consommation et c'est ici qu'après avoir rencontré d'abord des lois naturelles, nous allons en trouver qui ne le sont pas.

Histoire des réalités.

L'invasion du phylloxera a clos, vers 1870, l'âge d'or du vin et de la vigne. La prospérité était presque inouïe à ce moment. La vigne avait recouvert à peu près tout le terrain qu'elle peut occuper en France, et ses produits pénétraient partout, emportés par une sorte de ferveur générale, à laquelle les médecins ne marchandaient pas encore leurs encouragements. Les chimistes seuls, quand ils n'appartenaient pas aux régions vinicoles, commençaient à être un peu inquiets. Ils trouvaient que les vignerons traitaient un peu le monde en pays conquis. Non seulement ces négociants coupaient, dédoublaient, sucraient, vinaient leurs produits, et considéraient toutes ces pratiques comme parfaitement licites dès qu'elles leur étaient utiles, mais ils faisaient de

la chimie un peu douteuse : ils corrigeaient leurs vins avec de la potasse ou de l'acide tartrique, leur donnaient de la couleur et les *empêchaient de se gâter* avec du plâtre, et puis les déplâtraient avec des sels de baryte, qui sont vénéneux. L'un d'eux, s'étant bien trouvé de mettre dans sa cuve de l'acide sulfurique quand sa vendange était sale, avait réclamé hautement, dans un Congrès international de viticulture, à Montpellier, le droit d'employer cette denrée. Bref, tout le monde se croyait tout permis pour corriger les imperfections du vin, c'est-à-dire les remplacer par d'autres, invisibles ou moins visibles.

Cette inquiétante cuisine resta longtemps mal connue, et n'apparut que le jour où, le phylloxera ayant amené à 27 ou 28 millions d'hectolitres, de 1879 à 1892, la production vinicole qui avait atteint, en 1875, 85 millions d'hectolitres, il fallut bien faire sortir de quelque part le vin qui était encore demandé. Le commerce perdit alors tout scrupule. Comment oublier ces vins de sucre et d'alcool de betteraves, ou de raisins secs, et ces coupages avec tout ce qui pouvait humainement porter le nom de vin, etc. ? Ah ! vraiment, nous avons bu à ce moment, sous prétexte de vins, des liquides bien étranges. Et tout cela au milieu des plaintes des producteurs, qui protestaient que ces pratiques étaient pour notre bien et qu'il leur fallait la protection de l'État pour leur faciliter leur tâche. Qu'on se rappelle les franchises demandées pour le sucre ajouté à la vendange, l'histoire des vins d'Espagne, les raisins secs frappés de droits pour protéger contre eux les raisins frais !

Les intéressés se plaignaient encore quand on s'aperçut tout à coup que le public se désintéressait de la question. « Quoi ? C'est tout cela, le vin ? Nous n'en voulons plus ! Ils doivent avoir raison, les médecins qui le condamnent au nom de l'hygiène, et aussi par voie d'extension ceux qui en privent leurs malades. » Et c'est ainsi qu'une doctrine, si mal fondée scientifiquement qu'elle a battu en retraite à la première objection, s'est installée victorieusement dans l'esprit public. Si bien que lorsque, en 1901 et 1902, la production revint à ses anciens niveaux de 57 et 67 millions d'hectolitres, il n'y eut pas d'acheteurs, et les prix tombèrent à 5, 4, 3 et 2 francs l'hectolitre.

Franchement, c'est trop bête ! Ces populations laborieuses, propriétaires d'un sol et d'un climat exceptionnels pour la vigne, et qui souffrent, les voici qui, poussées surtout par l'ignorance des choses, en arrivent à se déchirer elles-mêmes et à se gâter l'avenir. Elles avaient une clientèle qui est perdue, par leur faute, et qu'il faut se refaire dans un public prévenu. Cela n'est pas impossible, car la cause est bonne. Mais il est temps d'y songer.

La première amorce d'un mouvement de revirement en faveur des vins s'est faite au lendemain de la loi qui a supprimé, ou à peu près,

les taxes de consommation de cette boisson. Il faut hautement se féliciter de cette loi. D'abord elle a, dans quelque mesure, fait au vin des excuses officielles, et a argué de sa valeur hygiénique pour justifier le traitement de faveur qu'on lui faisait. C'est en quelque sorte promettre que si ses producteurs renoncent à leurs anciennes pratiques abusives, pour revenir aux lois d'airain du commerce, on ne leur dira plus sérieusement qu'ils sont des empoisonneurs.

Mais il a manqué quelque chose à cette manifestation : de la conviction. Venue après tant de mesures législatives auxquels manquait le doigté, elle a eu l'aspect d'une annonce de rabais faite par une grande maison qui, ne vendant pas, rabat ses prix. J'aurais voulu quelque chose de plus crâne. J'aurais voulu que la France, pays priviligié au point de vue de la vigne et de ses produits, dise ceci, qui était la vérité : « Au premier jour où, grâce à l'énergie et au crédit de mes vignerons, j'ai pu reconstituer ou à peu près mes anciennes productions, j'ai tenu à les présenter au public débarrassées de tout ce qui peut gêner leur diffusion et leur vente. Voilà ma façon d'État de comprendre l'hygiène du vin! Voilà ma façon de Nation de comprendre ma présence dans le monde. » Un pareil début eût été digne du sujet, et peut-être eût-il donné quelque éclat à la rentrée du vin dans ses États.

Après quoi, je me serais remis à travailler, car il est bien clair que nous ne pouvons en rester là. Nous ne pouvons oublier le cri de tout à l'heure : cet alcool du vin est bien cher! Et, d'un autre côté, il ne semble pas qu'une diminution soit possible. Les tentatives faites au moment de la prospérité montrent bien qu'il n'y a pas de place chez nous pour une augmentation du territoire de culture de la vigne. Certaines régions qui en avaient essayé y ont renoncé depuis, en face de l'instabilité des climats, que la plante traduisait par des irrégularités de récolte. Peut-être, même, a-t-on abusé un peu de la patience de la vigne et de la nôtre sous ce point de vue ; on se contente, avec le raisin, de conditions de maturation inacceptables pour d'autres cultures, en se disant qu'après tout la vigne et le vin se tirent toujours d'affaire...

Il ne faut pas compter non plus sur de notables augmentations de rendement. La vigne a toujours été cultivée avec amour, et le vigneron a soin qu'elle n'ait jamais le droit de se plaindre. Nous ne dépasserons guère nos rendements actuels, près de 70 millions d'hectolitres pour près de 35 millions de Français, 2 hectolitres par homme et par an, alors que nous avons vu la dose de 1 litre par jour, soit de près de 4 hectolitres par an, être encore très hygiénique. La demande promet de dépasser toujours l'offre, surtout lorsque les préjugés actuels auront disparu et que la sotte guerre qu'on fait au vin comptera, avec

le phylloxera, comme la seconde plaie de la vigne en France à la fin du XIXe siècle.

Seulement, pour que cette campagne aboutisse, il faut la faire avec une préoccupation nouvelle. Le vin sera toujours une boisson de luxe par son prix, qui le tiendra toujours au-dessus de sa valeur comme alcool. L'acheteur aura toujours le sentiment, et, quand il le voudra, par les chiffres, la preuve que le vin lui fait payer cher ce qu'il lui donne, et je ne trouve pas que cela soit mauvais, l'idée d'un peu de luxe rattachée à cette boisson. Mais je voudrais aussi que le producteur ne tirât pas tout de suite de cette vérité la conclusion suivante : « Je vends de la marchandise de luxe, je peux augmenter mes prix. »

Il ne faut pas recommencer l'absurde commerce qui vient de finir. Il a été une campagne d'appétits : nous faisons une cam agne d'hygiène. Tout ce que j'ai dit ne vaut quelque chose que si e vin continue à être la boisson honnête et franche que tout le monde connaît. Je n'ai pas à signaler les fautes d'orthographe qu'on peut faire quand on le fabrique, ni à distinguer celles qui sont permises de celles qui ne le sont pas. Je dis seulement qu'on ne doit commettre que celles qui peuvent être inscrites sur la facture et entrer dans la discussion du prix. C'est un régime de bonne foi qui commence, et non un régime de dol. Nous ne voulons pas acheter, sous le nom de vin, des produits chimiques. Nous ne voulons pas payer, à cinq ou six fois sa valeur, l'alcool que nous y rencontrons, surtout quand il vient du privilège des bouilleurs de cru, et que nous pouvons le trouver beaucoup moins cher en le prenant dans le commerce. Si tout cela doit recommencer, nous vous laisserons consommer votre produit, et justice sera faite, car dans le procès, nous tenons cette fois le bon bout. Nous savons calculer. Le vin est entré dans un barême, et nous connaissons le point où il reste hygiénique pour le corps et cesse de l'être pour la bourse.

LES LIQUEURS

Histoire passionnelle.

En laissant pour le moment de côté d'autres boissons alcooliques moins importantes, comme les bières et les cidres, nous nous trouvons en présence de l'innombrable et remuante tribu de ce que le public appelle volontiers les alcools, et qui comprend les eaux-de-vie et les liqueurs à essences. Ce serait le cas de dire qu'ici le terrain est brûlant, car c'est lui qui porte la responsabilité de l'alcoolisme. C'est une raison de plus d'en parler avec tranquillité : cela nous est d'au-

tant plus facile que pour nous une bouteille de liqueur représente une force, et qu'on ne se fâche pas avec des forces. On les étudie.

Appliquons à celle-ci notre programme d'examen. Séparons d'abord avec elle l'action de la nature et l'action des hommes, le prix de la denrée telle que la nature nous le fait, et le prix artificiel créé par l'impôt. Nous avons pu ne pas faire cette distinction pour le vin, qui est assez cher pour qu'on puisse négliger les faibles droits dont il s'accompagne d'ordinaire. Cela est nécessaire avec un liquide pour lequel l'impôt est de 5 à 10 fois la valeur vénale. A peine fabriqué, un hectolitre d'alcool doit à l'Etat une somme de 220 francs, dont la perception constitue du reste un problème sérieux, résolu seulement d'une façon théorique.

A combien le trouve-t-on chez le producteur, et quel serait son prix s'il n'y avait pas d'impôt? Naturellement, le prix est variable suivant les provenances. Pour prendre un prix moyen, nous accepterons celui de l'alcool au moment où les distilleries commencent à s'arrêter chaque année, parce qu'elles fabriqueraient à perte. Ce cours, qui est facile à relever sur les publications de la Bourse du commerce, est d'environ 35 francs pour l'hectolitre à 90°. En prenant 40 francs pour l'hectolitre à 100°, nous aurons un chiffre suffisamment exact, et qui nous sera commode, car c'est le chiffre que nous avons accepté pour l'hectolitre de vin à 10°. Ce vin contient à l'hectolitre dix fois moins d'alcool pur. Il est payé le même prix. Donc si, comme tout l'annonce, la valeur physiologique ou mécanique de l'alcool de bette rave est la même que celle de l'alcool de vin, la force est dix fois moins chère avec le premier. Ce qu'on demande à une bouteille de vin à 40 centimes peut s'obtenir avec moins de cinq centimes d'eau-de-vie. Horreur! s'écrira-t on, pouvoir s'enivrer pour un sou, s'il n'y avait pas de droits! Mon Dieu oui, répondrai-je: c'est fâcheux, mais c'est comme cela.

Et je crois, en effet, qu'un jour viendra où il n'en coûtera presque rien de boire trop, comme il n'en coûte presque rien de s'empoisonner avec du tabac ; car au fond, si on réfléchit, c'est la même chose, sauf qu'on sait que l'alcool est utile, tandis qu'on n'a pas encore réussi à trouver le principe nutritif de la fumée de tabac.

Quoi qu'il en soit, on devine la supériorité d'une marchandise qui se présente sur le marché dans ces conditions d'économie. Cela et sa mauvaise réputation ont même fait qu'on lui en a su mauvais gré. Tout le monde s'est dit qu'il n'y avait pas à se gêner avec elle. Vite, un impôt! Et c'est ainsi qu'a commencé un combat un peu comique entre cet alcool qui ne voulait pas mourir, les fanatiques qui voulaient le tuer, et l'Etat qui, laissant les uns crier et les autres boire, ne songeait qu'à ses rentrées. Le combat n'est pas fini. L'intéressant

serait de savoir qui l'emportera. Je crois que c'est l'alcool, et je voudrais en dire les raisons.

Raisons de l'alcool.

En présence de ses vigoureux adversaires, l'alcool, dès qu'il s'est mis en défense, a facilement gagné les premières manches. « Nous nous défions de vous, lui disait-on, mais nous nous défions encore plus de la bande d'alcools et d'huiles essentielles qui vous accompagnent et dont vous ne réussissez pas à vous débarrasser, car nous savons qu'il y en a dans les alcools les plus purs, et même nous avons appris en 1891, que des alcools de vin étaient venus s'en purifier, sans trop bien y réussir, dans les grandes usines à rectification des alcools de betterave. Nous nous défions encore plus de vous, ajoutait-on, quand, devenus plus audacieux et presque arrogants, vous vous faites gloire de ces liqueurs où vous ajoutez, aux impuretés naturelles de l'alcool, d'autres que vous fabriquez vous-mêmes, et qui n'en valent pas mieux. Or, ces matières, nous les avons étudiées, et nous savons que ce sont des poisons... Oui, des poisons! et la preuve est qu'en les séparant de votre absinthe, les injectant par gouttes à des chiens, je puis les faire mourir de suite, avec des contorsions variées qui rappellent celles de l'ivresse. »

« Messieurs, pourrait répondre l'alcool, personne n'en est plus désolé que moi, et personne ne plaint davantage ces malheureuses bêtes, victimes des produits que je convoie; elles ne méritaient pas de mourir, car le raisonnement auquel on les a sacrifiées ne vaut pas grand'chose. Appliquez-le à la pharmacie, pour voir: faut-il renoncer aux médicaments parce qu'ils sont tous des toxiques, pris à dose assez élevée? Appliquez-le à la cuisine, et proposez au physiologiste le plus déterminé de lui injecter dans les veines la dose de vinaigre qu'il consomme hygiéniquement dans sa salade, et vous verrez avec quelle prudence il se tiendra hors de portée de votre seringue. Or, l'acide acétique, c'est mon cousin. Nous sommes deux aliments, et c'est chez lui que la digestion entre quand elle sort de chez moi. Bons princes tous deux, nous devenons terribles lorsque nous changeons de voie pour nous mettre en rapport avec l'organisme. A chacun son chemin, telle est notre maxime, qui est, au reste, celle de tous les aliments. Mais pourquoi diable vous en prendre à nous quand c'est vous qui péchez par ignorance ou par imprudence!...

« Remarquez que nous ne vous prenons pas en traîtres. Tout est organisé chez nous comme si l'homme était un être insouciant et

borné, qui a besoin d'être averti à tout instant qu'il est sur la bonne voie. Le pain, la pomme de terre sont très peu dangereux, ils sont aussi peu savoureux: la viande, le bouillon avertissent au passage l'organe du goût qu'il faut un peu de surveillance. L'eau-de-vie, le thé, le café. sont dangereux dans le degré où ils flattent le palais, et l'alcool à peu près pur, qui est le plus inoffensif des alcools, est fade à ne pas pouvoir être consommé seul, tandis que les autres alcools tirent en entrant toutes les ficelles gustatives. Le portier, je veux dire l'homme, est ainsi averti par des bouquets de saveurs variées qui sont le fondement de sa vie, puisque ce sont elles qui lui ont appris à choisir ses aliments, à les améliorer, à rechercher les uns et à éviter les autres. Mais, encore une fois, en quoi sommes-nous responsables de ce que l'homme se pervertit parfois le goût? La perversion implique une habitude. Pourquoi s'est-il laissé prendre une habitude? »

« Permettez-nous donc de nous laver les mains de tous ces reproches. Comme toutes les forces de la nature, l'électricité, par exemple, nous sommes parfois un danger, mais il faut, ou nous laisser, ou nous prendre tels que nous sommes, avec nos défauts et nos qualités. Or, je vous défie de vous passer de nous.»

Raisons de l'hygiéniste.

Peut-être est-il fâcheux que la défense de l'alcool n'ait pas pris plus tôt, dès qu'elle en a eu le droit, ce ton un peu cassant. Peut-être aurait-elle évité aux hygiénistes quelques écoles, je dis à ceux d'entre eux qui, sans boire, sont intempérants. Leur mot d'ordre est :« Supprimons ce qui gêne! En attendant d'avoir supprimé l'alcool, enlevons-lui au moins ce qu'il contient de plus nuisible, ces alcools supérieurs, ces aldéhydes, ces huiles essentielles, et fabriquons pour le public un alcool nouveau, que nous pouvons appeler hygiénique, pour le distinguer du premier, et qui le sera, au moins pour le Trésor; la question de l'alcoolisme n'est qu'une question de rectification, et nous l'aurons résolue d'une façon fort simple. » Là-dessus, divers pays se sont donné le luxe d'une législation spéciale.

Malheureusement, le consommateur s'est obstiné à préférer l'alcool avec les saveurs qu'il connaissait, et il a fallu les lui rendre, au risque de les voir qualifiées d'impuretés. Lorsqu'il en est débarrassé, l'alcool, nous l'avons dit, n'a que la force et pas de parfum. Il est fade, il trompe son monde. Le public a réclamé son alcool odorant, son *fusel*, et la tentative a avorté.

« S'il est si difficile d'enlever à l'alcool ce qui nous gêne, nous

pourrons au moins, s'est-on dit, empêcher qu'on lui ajoute de nouvelles horreurs, et nous avons précisément devant nous, dans cet ordre d'idées, une corporation qui semble avoir pris à tâche de donner à l'alcool impurifié les formes les plus séduisantes possible. Nous reconnaissons que quelques-unes ne sont pas sans valeur. Mais celles là sont chères, et nous ne redoutons pas leur ivresse, qui aura toujours quelque chose de discret et de distingué. Que dire en échange de celle qui se verse tous les jours à grands flots sous nos yeux, celle des apéritifs! Ne serait-ce pas un bien pour tous si on pouvait gêner ou interrompre ce commerce, où même celui qui y gagne ne peut toucher ses bénéfices sans quelque remords? Vite une nouvelle loi. » C'est ici que les difficultés commencent.

Une bonne tradition de nos pays civilisés veut que la loi soit écrite: c'est le commencement de la sagesse. Cela ne suffit pas pour faire de bonnes lois. Mais on ne saurait croire combien il est profitable d'avoir à mettre, en noir sur blanc, certaines pensées des hommes. Quand on a dit à nos réformateurs: « Voyons, voulez-vous supprimer la chartreuse, le kummel, le curaçao, l'anisette? — Peut-être ferions-nous bien, ont-ils répondu, mais ce n'est pas la peine d'essayer, aucun député ne voterait cela. — Alors c'est l'absinthe et ses succédanés que vous poursuivez? — Oui, mais nous ne voulons pas le dire. Nous nous défions trop ici des députés et des électeurs. — Alors! que faire? — Eh bien, mettez qu'il y aura deux catégories d'essences; les unes permises, les autres prohibées. Pour nous éviter les ennuis et les difficultés des dosages, la prohibition sera absolue pour celles qui seront défendues; les fabricants travailleront en liberté avec les autres. — Et où sera l'absinthe dans cette série de préparations nouvelles? — Nulle part, nous l'espérons bien, car si elle existait encore ce ne serait pas la peine d'avoir fait campagne. La tuer sans le dire, pour ses méfaits, c'est le fin du fin. — Et qui prendra les responsabilités, et qui fera la séparation des bons et des méchants, dans cette théorie d'essences? — Eh bien, n'avez-vous pas l'Académie de médecine?»

Et l'Académie fut consultée. Et elle le fut sans joie. Bien qu'elle soit, par ses statuts, obligée de répondre aux questions du gouvernement quand il est embarrassé, tout le monde, interrogateurs et interrogés, vit bien qu'il y avait anguille sous roche, et la question fut de répondre sans se compromettre. C'est l'affaire des commissions, et le vieux mécanisme fonctionna une fois de plus à la façon ordinaire. A mon avis, les corps savants ont tort quand ils se défilent. Il fallait tirer son chapeau, et dire: « Monsieur le ministre, vous me demandez s'il y a de bonnes essences et s'il y en a de mau-

vaises. A mon grand regret, je ne sais pas ce que c'est qu'une essence : ce n'est pas un corps défini. Sur la même plante il varie avec la saison, et à plus forte raison d'une année à l'autre. Une essence n'est jamais semblable à elle-même. Dès lors, comment pourrais-je répondre à vos questions? Il faudra repasser dans cinquante ans pour savoir où sont les bonnes et les mauvaises, si on continue à travailler, et il faudra un siècle, peut-être même davantage, si vous voulez obtenir de nous ce que le public, tantôt railleur, tantôt sérieux, vous prie de nous demander; une formule d'absinthe sans absinthe. Nous vous verdirons de l'orgeat, si vous voulez, mais soyez sûr que le public trouvera des différences. »

Raisons de l'industriel.

Voilà ce que l'Académie de médecine eût pu répondre au Pouvoir, en restant vraie et correcte. Mais la question ne recevra pas sa réponse tant que les fabricants de liqueurs n'interviendront pas pour parler le langage qui leur convient. « Jusqu'ici, pourraient ils dire, nous avons comparu comme des accusés dans le procès de l'alcoolisme. C'est à peu près aussi raisonnable et aussi juste que si on en voulait à l'imprimerie de faire de mauvais livres. On n'a aucun droit de nous traiter ainsi. Nous reconnaissons la grandeur du mal, son ubiquité et ses menaces. Nous appelons de tous nos vœux les mesures destinées à le combattre, et on le verra, aussitôt que ces mesures ne seront plus uniquement dirigées contre nous par la préoccupation de nous trouver coupables.

« Qu'on nous asseye de préférence aux bancs des témoins. Nous avons, sur tous les points, plus d'expérience que personne, même que l'Académie de médecine, qui n'a aucune qualité pour composer des liqueurs. Nous, nous sommes des pharmaciens. Tout notre art est de l'art pharmaceutique, celui qui s'occupait de la préparation des élixirs, eaux de mélisse, vins fortifiants, vins médicinaux. Nous avons, il est vrai, largement développé cette branche de leur industrie, aidés par le goût public, qui est au moins pour moitié dans tout commerce qui s'étend. Mais nous sommes restés leurs confrères. La preuve est qu'ils nous imitent de leur mieux quand ils le peuvent. La preuve aussi, c'est que dans ceux des Etats d'Amérique qui ont prohibé l'alcool, les pharmaciens ont seuls la permission d'en vendre sous couleur médicale. Nous-mêmes, quand l'alcool, carburé ou non, aura pénétré dans l'industrie, nous aurons comme confrères ceux qui débiteront les mélanges nombreux qui seront en usage. Nous serons tous les administrateurs compétents de la force-alcool, et nous serons tous surpris si on consulte des médecins sur le chauffage des bicyclettes. »

« Vous venez d'avoir un Congrès des études économiques sur les emplois industriels de l'alcool, conduit par son président avec un grand accent de sincérité et de liberté dans la bonne humeur. Etes-vous mécontents de l'esprit que vous y avez trouvé et de ce que vous y avez appris? Vous avez en ce moment en fonction une grande commission extraparlementaire, divisée en trois sous-commissions moins nombreuses et mieux spécialisées, où les diverses industries de l'alcool aliment sont représentées : vous verrez ce qui en sortira si vous savez vous y prendre. Mais ce qu'il faut y introduire tout d'abord, c'est ce qui a paru y manquer jusqu'ici; c'est la confiance les uns dans les autres, c'est le sentiment qu'on est en présence du *fair play*, dans lequel tous les intérêts se débattent au grand jour. En un mot, c'est la sincérité. »

Je sais bien que je vais faire crier en parlant ainsi. Mais cela m'est un peu égal. J'ai vu. Chacun, après avoir dit son opinion, pense au péril caché d'avoir parlé s'il a dit ce qu'il pense, à celui de n'avoir rien dit s'il a gardé le silence, et comme au-dessus des débats plane, d'ordinaire, silencieusement la volonté du ministre des Finances ou de l'Administration, la grosse préoccupation est de découvrir à quelles sources profondes va s'abreuver la loi dont on pâtira demain.

On comprendra que les distillateurs et les fabricants de liqueurs, qui se présentent à ces grandes assises avec le poids de la réprobation officielle soulevée contre eux à propos de l'alcoolisme, aient été un peu inquiets, malgré le bon accueil que leur faisait le public. Je leur aurais voulu plus de tranquillité et plus d'assurance scientifique.

« Voyons, Messieurs, aurais-je voulu leur entendre dire, comme conclusion du petit discours que j'ai commencé pour eux, de quoi s'agit-il? De conserver, sous forme de recettes, la grande industrie que nous représentons, en diminuant le plus possible les risques qu'elle fait courir, nous ne le nions pas, au consommateur. Convenez d'abord avec nous, car c'est ici une simple question d'arithmétique, que, même dans nos liqueurs, la plus grande source de péril est dans l'alcool, et nous aurons fait un pas, car cela prouvera que le point capital, essentiel, pour nous, est l'emploi des essences, ou plutôt des végétaux qui en fournissent. Vous ne vous y êtes pas trompés, et dans ces projets de modification que vous nous réservez, vous vous êtes bornés à demander une réglementation de l'emploi de ces éléments essentiels de la fabrication. Mais vous vous êtes heurtés à l'ignorance où vous êtes, et nous aussi, au sujet de ces produits. On aurait pu croire que cela vous aurait conduits à de la prudence. Mais voilà, Administration, vous n'avez pas de méfiance : vous parlez alors même que vous ignorez, et chacune de vos paroles compte. »

« Comme je n'ignore pas que je parle devant vous, que j'accuse,

laissez-moi passer en Belgique, pour continuer. Là aussi, il y a un gouvernement et une opinion publique ayant la hantise de l'alcoolisme, et un arrêté vient d'être pris, sur les avis du Conseil supérieur d'hygiène publique, pour ne tolérer dans les boissons spiritueuses que les substances les moins dangereuses pour la santé publique et *pour en limiter strictement la proportion*. Nos voisins ont borné leur horizon pour y être mieux les maîtres, et, pourtant, tout le monde a l'air d'être mécontent de cet arrêté, qui est peut-être entré dans la bonne voie, mais qui, en confiant à une balance le soin de juger si une liqueur est bonne ou mauvaise, a placé à la base de l'arrêté un joli paradoxe. L'administration belge a aussi parlé sans savoir. Son critère eût peut-être suffi, si la substance qu'elle appelle dangereuse eût été unique, faite, par exemple, d'alcool amylique. Bien qu'il y en ait plusieurs, de ces alcools, on aurait pu voir si la dose était réglementaire. Mais comment faire lorsque, par définition, ces impuretés sont multiples et inconnues, et d'actions très inégales? Eh bien! dans notre opinion, une administration se coule quand elle aboutit à de pareils impairs. C'est l'arbitraire, et c'est nous qui payons. »

« Personne n'a le droit de nous demander de nous associer à cette œuvre. Mais si un Conseil supérieur d'hygiène, restant dans les mêmes voies, nous conviait à la recherche du moyen, non pas de supprimer les boissons alcooliques (cela, nous sommes bien tranquilles, n'arrivera jamais), mais d'en diminer les dangers, comme ce serait les rendre plus attrayantes, nous serions bien sots de lui marchander notre concours. Il y a sûrement beaucoup à trouver dans cette voie, où nous avons de l'expérience... Combien nous. gagnerions peut-être à remplacer la balance des Belges par un conseil plus physiologique, par des animaux d'expérience nous avertissant, même au prix de quelques épreuves, de celles de nos liqueurs qui doivent être réformées! Mais qu'y a-t-il dans tout cela? Des recherches à faire, et le renoncement absolu à parle avant de savoir. Eh bien! Administration, voulez-vous que nous commencions de suite?

LES DROITS

Raisons du fraudeur.

Dans les courts développements qui précèdent, je n'ai pas laissé pénétrer le côté fiscal de la question. J'ai dit qu'heureusement il n'existait pas, ou à peine, pour les vins, qui circulent en franchise presque absolue de droits. Mais j'ai évoqué le souvenir des 220 francs que doit payer tout hectolitre d'alcool qui a subi l'épreuve de la vente. J'ai signalé l'énormité de ce chiffre, comparé au prix réel de la marchan-

dise. Il n'étonne guère plus personne. Le contribuable s'habitue à le payer, théoriquement au moins, comme l'Administration à le recueillir. Elle est faite pour ramasser cet impôt, et le ramasserait presque aussi tranquillement si on le doublait ou le triplait. Il n'y a de comparable que la tranquillité du percepteur, en face de la marée montante des impôts directs.

Pourtant, de divers côtés, se manifeste un sentiment de lassitude et de plénitude. Je ne parle pas seulement du côté commercial de la situation. Depuis que l'alcool met en mouvement de si gros capitaux, il a cessé d'être une denrée de marché, il est devenu une marchandise de bourse sur laquelle on joue et on débat des intérêts qui n'ont rien à faire avec l'agriculture, l'industrie et l'hygiène. Cet inconvénient de l'agio existe aussi pour les blés, pour les sucres. Mais, pour les alcools, l'impôt dépasse dix fois la valeur vénale. Chacun, dans une transaction, vise la part considérable qui va s'en aller à l'État, et chacun tâche d'en garder un morceau. La fraude est organisée contre ces droits; elle se fait dans des conditions qui en font des nazardes au nez de l'administration, quand ce ne sont pas des luttes à main armée; l'État est naturellement mécontent. De son côté, la partie qui paye s'exaspère contre celle qui fraude, et s'il y a quelque part une image de désordre dans un état policé, c'est dans la perception des droits sur l'alcool d'aujourd'hui. J'ai déjà prononcé à ce sujet le mot de gabelle, je le répète ici avec conviction, parce que je le trouve juste et qu'il fait réfléchir.

Comme toujours, ce désordre est l'aboutissant d'une série de faiblesses et d'oublis des principes. Y a-t-il quelque chose de plus extraordinaire que le régime des bouilleurs de cru? Quand il s'est agi de percevoir l'impôt de 220 francs par hectolitre sur l'alcool, il s'est trouvé beaucoup de gens préférant ne pas le payer, et arguant de leur droit de propriété sur l'alcool provenant des fruits poussés sur leurs terres. Il y a eu autour de cet argument des luttes épiques, analogues à celles qu'avait soulevées l'établissement de l'impôt sur les vins, mais bien plus intenses, et qui durent encore.

La chose est pourtant bien simple. Il fallait dire : « Je respecte vos droits de propriétaire sur votre alcool, comme je les respecte vis-à-vis de votre fourrage, de vos blés et de vos vins. Vous avez la liberté de les consommer sans rien dire à personne. Vos marchés sont privés, ou à peu près, et vous auriez la même liberté pour l'alcool, si je n'étais pas intervenu, moi État, pour décider, au nom de l'intérêt public, qu'un droit sera perçu à mon profit, au moment de la vente. C'est un impôt que je prélève, absurde, coûteux, qui n'a plus d'excuses s'il n'est pas perçu sur tout le monde, et si vous, propriétaire producteur, vous ne me restituez pas les 220 francs par hectolitre qu'a dû vous donner le client non producteur, je suis lésé. Si vous ne me rendez rien, il y a

un voleur des deniers publics, et c'est vous. Si vous laissez par convention une part de ce bénéfice dans la poche de votre client, il y a deux voleurs, dont le second n'a même plus à arguer du droit de propriétaire. En réalité, il n'y a de droits nulle part, il n'y a que des appétits. Vous êtes des associés qui détournent à leur profit les deniers de l'État. Et vous êtes nombreux à faire ce commerce ou à en bénéficier : plus d'un million de vendeurs, plus d'un million d'acheteurs et leurs familles. Si bien que les autres les jalousent ; et qu'à côté des 5 ou 6 millions de Français qui gagnent à vivre sur les marges du code, et qui ne payent pas leurs contributions ou les payent avec de l'argent pris à l'État, vous avez une autre couche qui les dénonce, et une troisième qui s'élève contre un état social dans lequel un cinquième de la nation arrive à s'exonérer d'un impôt que paye le reste. Sommes-nous loin de la gabelle? Et peut-on s'étonner de trouver un peu en décomposition non seulement les finances, mais aussi l'esprit public d'un pays dans lequel des mœurs aussi coupables trouvent au Parlement des défenseurs attitrés? Que répondrez-vous aux socialistes? Et aux anarchistes? »

Raisons de l'administration.

Il serait facile de citer de nombreux exemples de ces faiblesses législatives qui sont devenues coupables. Mais la législation de l'alcool souffre plus profondément : elle périt de ce qu'elle est une législation de raccroc, faite d'articles qu'on a rajustés bout à bout, au fur et à mesure des besoins, sans que personne semble avoir pensé un instant qu'une loi sur l'alcool ne pouvait pas être faite comme une loi sur les portes et fenêtres. Il y a des lois naturelles, plus fortes que les parlements. On peut ne pas les connaître, et c'est souvent le cas. On peut les transgresser. Mais, quand on n'est pas d'accord avec elles, elles se vengent, comme elles le feraient d'un garçon jardinier qui planterait ses arbres la tête en bas. C'est ce qui est arrivé à propos de l'alcool. Voyons comment la nature s'y est prise pour donner des leçons aux législateurs audacieux qui, eux aussi, délibèrent sans connaître.

Nos sénateurs et députés ont méconnu les propriétés de l'alcool, et l'ont traité comme la première substance venue. D'abord ils ont ignoré (mais on ne peut pas leur en vouloir beaucoup, car la connaissance en est toute récente), ils ont ignoré, dis-je, sa valeur comme force. Si au point de vue physiologique cette force en fait un aliment, on ne voit pas en quoi il est logique de le traiter autrement que le blé, le sucre ou la betterave.

Si j'envisage maintenant cette force au point de vue mécanique, où l'alcool a pour concurrents la houille, le pétrole et les huiles, on pouvait

se demander, sans être trop en avant de son siècle, si un impôt de 220 francs était un trait de génie. Ici, comme les législateurs *savaient*, il y avait responsabilité, et les lois naturelles ont commencé à prendre leur revanche. Gouvernement et administration s'occupent en ce moment à rechercher comment on pourrait décharger l'alcool-force sans décharger l'alcool-aliment, et comme c'est le même corps qui est l'un et l'autre, ce n'est pas commode. Il a fallu résoudre un gros problème pour carburer l'alcool, et l'Administration poursuit de ses soupçons et accable de papiers multicolores tout être qui demande à gâter son alcool en le transformant en alcool d'automobile. Quant à la licence de vendre au public cet alcool dénaturé, elle rappelle celle qui autrefois permettait d'être pharmacien : on prévoit qu'il faudra bientôt des examens, et les alcools de chauffage promettent d'être des produits assez compliqués pour mériter, surtout avec une administration toujours un peu tracassière, un brevet de chimiste à leurs marchands. Un épicier ne suffit plus.

Ce n'est pas tout. La nature s'est évidemment employée à faire de l'alcool un produit commun : l'administration méconnait cette loi et s'attache à le rendre rare par son prix. *Donc, elle a de la peine;* c'est la revanche du dédain qu'elle a eu pour la loi naturelle.

Théoriquement, elle est heureuse, car sa matière imposable est partout. Partout où il y a du sucre, il y a de l'alcool. Il y a vingt-cinq ans, on comptait 87,000 bouilleurs de cru, il y en a maintenant 13 fois autant : 1,136,000, et on ne les connaît pas tous. Cela fait une moyenne de 50,000 citoyens par an qui ont senti le désir de connaître les sentiments avec lesquels le bouilleur déguste son alcool, et, par parenthèse, on s'étonne de voir grandir l'alcoolisme, lorsqu'il y a tous les ans 50,000 buveurs nouveaux, buvant gratuitement et joyeusement à la santé de ceux qui payent. Il n'y a aucune raison pour que cette progression cesse, la qualité de propriétaire, exigée par la loi, se trouvan acquise sinon légalement, du moins pratiquement, par un achat de sucre hez l'épicier. Et on voit le moment où, en France, sera bouilleur de cru qui voudra, en conformité stricte avec le règlement relatif à la provennace des jus sucrés, en désaccord complet avec la loi fiscale et la justice. On ne peut pas envier ces nouveaux fraudeurs pour la qualité de l'eau-de-vie qu'ils boivent. Ces opérations, en petit, donnent presque toujours des produits mal rectifiés, et à peine buvables. Mais compter pour cela qu'ils ne seront pas bus, c'est compter sans les illusions et la petite vanité du propriétaire. Rien de dangereux au contraire dans une cave comme ces produits qui ne sont ni bon ni mauvais, et qui vont partout. Voilà les facteurs puissants de l'alcoolisme: ils régalent l'homme la femme, et vont, au lieu de sucre et de confitures, sur les tartines de l'enfant. Mais allez donc les prendre !

C'est ce jour-là que je vois l'Administration bien embarrassée. Elle verra combien sont absurdes les impôts disproportionnés sur les denrées communes, en particulier sur une substance aussi parfaite dans son genre que l'alcool. Ces impôts, il faut les réduire le plus possible, pour ne pas les voir se réduire eux-mêmes, parce que le public s'insurge et ne paye plus.

Monopole.

Le sentiment qu'il y a quelque chose de pourri dans le royaume de Danemark est tel, à propos de l'alcool, que tout le monde a ouvert l'oreille dès qu'on a parlé de réforme et de monopole. L'État a semblé le seul capable de se tirer des difficultés de la situation qu'il s'est faite, et chacun avait son rêve, le mot de monopole permettant tout. « Il est impossible, disaient les gens réfléchis, de songer à uu remaniement quelconque, sans que, tout de suite, saute aux yeux l'absurdité du système d'impôts sur l'alcool. On a commencé par atteindre chez lui la boisson préférée de l'homme : on a continué tant que l'impôt n'a pas fléchi, par suite de l'exagération. On a découvert ensuite que l'alcool avait une puissance calorifique, pour laquelle il entrait en concurrence avec le charbon et le pétrole, et on s'est senti obligé de le ménager comme provenant du sol national. Il a fallu alors au moins deux tarifs pour la même suhstance. Voilà que les savants, que Dieu confonde, découvrent en outre qu'il y a de l'alcool-aliment, nourriture à bon marché, et qui mérite à ce titre un traitement de faveur, qu'on se gardait de faire au gérant de l'alcoolisme. Enfin, comme composé chimique, l'alcool a des propriétés précieuses pour certaines industries, pharmacie, parfumerie, vernis, produits chimiques, et qui, faute de pouvoir s'en servir en France où il est trop cher, vont s'implanter en Angleterre ou en Allemagne. Voilà dix, vingt usages nouveaux auxquels aucun industriel ne peut songer avant d'avoir fait sa petite paix avec l'administration des contributions indirectes, qui ne consent pas facilement à voir dans l'alcool autre chose que la marchandise de luxe qu'elle a créée. C'est absolument comme si, un impôt étant mis sur le pain quotidien de l'industrie, l'acide sulfurique, on le taxait suivant l'emploi en réclamant proportionnellement plus de droits aux industries qui en consomment davantage. Il est impossible que le côté extravagant de cette conception et de cet impôt ne frappe pas tout le monde, et qu'on n'y touche pas si on touche à quelque chose. » Voilà un raisonnement rempli de sens commun. Mais, pratiquement, à quoi aboutissait-il? à la diminution des droits? à l'augmentation? à une péréquation? Personne ne le savait. En attendant, le mot de monopole, qui couvrait tout, était sympathique.

Ceux qui avaient l'obligation d'y regarder de plus près, parce qu'ils

avaient dans l'affaire des intérêts parfois très gros, raisonnaient de façons diverses. Le cri général était à peu près celui-ci : « Quel bonheur si, sous prétexte de monopole, l'État voulait bien se charger de la partie difficile de notre travail *sans que nous y perdions !* Il est certain qu'il s'en acquitterait mieux que personne, et nous serions bien plus tranquilles. Croyez bien que les bouilleurs de cru n'ont aucune joie à frauder l'Etat, et qu'ils seraient au contraire très heureux de le trouver comme acheteur, lorsqu'ils ont quelque chose à vendre. Croyez aussi que les distillateurs, une fois libéralement expropriés de leurs usines, suivraient avec intérêt les efforts de l'État pour réduire les impuretés au minimum tolérable. Si le monopole nous vaut cela, vive le monopole ! »

« Mais qu'allons-nous devenir dans ce tohu-bohu, nous, disaient de leur côté les employés de cet immense labeur ? Nous voyons bien que, avant d'avoir fini son rêve de monopole, le pays abdique la moitié de son œuvre. Il renonce à être producteur d'alcool, c'est-à-dire agriculteur, vigneron, brasseur, et, d'une manière générale, les ouvriers agricoles peuvent être tranquilles, ils ne changeront pas de maître. Mais nous, employés, contre-maîtres et ouvriers des industries, qu'allons-nous devenir si, comme cela est probable, l'État se désintéresse de nous. Et puis, quand l'alcool ayant reçu ses diverses formes commerciales, il faudra aller au client, où prendra-t-on les débitants ? Il y en a 411,000 en ce moment. Ce sont d'énergiques partisans du monopole, si l'État les conserve et en fait des employés ; ce sont des gens furieux s'il les met de côté. »

Possibilités et impossibilités.

Voilà, n'est-ce pas ? une inquiétude qui se comprend et des questions qu'on a le droit de se poser. Je n'ai pas encore tout dit. Je parlais tout à l'heure de ces lois faites à l'aveuglette, sans étudier les propriétés particulières des substances qu'elle ont à régenter. Nous en connaissons déjà quelques exemples. Toute tentative de monopole me semble faite pour en révéler un nouveau. *Il n'y a pas de monopole possible lorsque la matière à monopoliser est en quantité illimitée.* Prenez comme exemple l'oxygène de l'air. Il n'y a pas de denrée plus utile et d'un usage plus général. Vous l'avez frappé de l'impôt autant que vous l'avez pu, par la cote personnelle, qui vous permet de le respirer, par l'impôt des portes et fenêtres, qui lui permet d'entrer chez vous, par d'autres impôts directs avec lesquels vous avez assumé la charge de le rendre salubre... Vous ne pouvez pas le monopoliser. Lorsque vous

aurez monopolisé l'alcool, si vous le revendez au prix coûtant, personne ne fera d'objections, ni de contrebande; vous risquez même de vous faire de chauds partisans. Mais si vos bénéfices dépassent ceux que peut se promettre l'industriel à faire le même travail que vous, surtout une industrie condamnée par la force des choses à être modeste, vous verrez reparaître de l'alcool qui n'aura pas passé par le monopole, et je vous défie bien d'éviter cette fraude, même avec vos bandes irremplaçables et vos bouteilles merveilleuses qui ne peuvent se remplir qu'une fois. Comme j'ai l'âme généreuse, j'y ajouterai autant d'employés nouveaux que l'administration des contributions indirectes pourra raisonnablement nous demander.

Voilà l'inconvénient d'être dans un pays où poussent tant de matières alcoolisables. En Allemagne, où l'on va quelquefois chercher des exemples, on ne transforme guère que la pomme de terre et la betterave, et il a suffi d'une sorte de syndicat, où sont entrés à peu près 4,000 distillateurs ou grands propriétaires, pour constituer le monopole. J'ai dit plus haut que nous avions en France plus d'un million de bouilleurs de cru. Cela fait une différence.

De plus, chez nous, la Régie a conduit ces derniers à faire trop d'alcool, comme elle avait conduit d'autres industriels à faire trop de sucre. C'est Elle, surtout, c'est-à-dire son manque de gouvernement, qu'il faut accuser, si nos agriculteurs sont entrés si facilement dans des voies desquelles il faut sortir aujourd'hui, on ne sait encore au prix de quelles souffrances.

En ce moment, en moyenne, le quart de la production en alcool est de trop. Ces excédents attirent sans cesse l'attention sur eux. C'est à eux, au moins autant qu'aux opérations de bourse, qu'est due cette instabilité du prix de l'alcool, si redoutable pour l'industrie tout entière. Ils ont naturellement pesé sur toute la conception du monopole. Les uns ont demandé que tous les producteurs de phlegmes dénaturent obligatoirement un cinquième de leur production : charmante façon d'agir que de commencer par gâter une denrée pour qu'elle soit plus vendable. D'autres sont venus et ont dit : « Ne vous inquiétez pas! Je vous achète les trois quarts de votre production à un prix, fixé par la loi, assez haut pour que le prix de ces trois quarts représente le prix de revient de toute la production. Le dernier quart vous restera gratuitement et vous en ferez ce que vous voudrez. » Moi, j'interviens avec une solution plus pratique.

Je propose de brûler tous les ans, le jour de la fête nationale, tous ces excédents dans le cratère d'un ancien volcan, et je demande que ce soit le Pariou en face de Clermont. Ce sera au moins un beau feu d'artifice !

J'ai l'air de rire. Je suis très sérieux. Je défie qu'on trouve une

manière de se débarrasser des excédents qui soit plus nette et plus sûre; ce sera l'équivalent des vingt jours de vente au rabais dans les grands magasins : cela les nettoie, jusqu'à l'année prochaine. C'est que je sais bien avec quelle rapidité les matières laissées gratuitement aux fabricants vont remonter à la surface, pour venir faire concurrence à la même matière, vendue par le même fabricant, et qui aura bénéficié du prix de monopole. Et voilà, dirai-je, ce que produisent des lois bourrées de fictions et d'impossibilités, comme on nous en fait tant aujourd'hui, avec tant de bonne volonté. Si la loi du monopole doit en être encore une, je me prononce nettement : pas de monopole.

CONCLUSIONS

Suppression de la Régie

Je crois que je peux dire nettement la conclusion unique à laquelle conduisent les diverses pages de ce livre : c'est la suppression graduelle des droits sur l'alcool, appuyée, comme première contre-partie économique, sur la suppression de l'administration des contributions indirectes. Nous venons de voir combien il est indispensable de changer de système dans notre facon de comprendre et de gérer nos intérêts de ce côté. Nous faisons partout fausse route. Ce sera dire hautement et nettement qu'on s'oriente autrement pour l'avenir.

Je prie qu'on ne me croie aucune haine ni aucune rancune contre l'administration. Je suis convaincu, au contraire, qu'elle a toujours bien régi ce qu'elle croyait notre intérêt, et interprété avec scrupule l'esprit et la lettre des lois. Mais si l'alcool a désormais franchise de courir, ses menins ordinaires deviennent inutiles, et je demande qu'on le dise. La fin des indirectes serait la fin d'un système.

Il est clair qu'on y mettrait de la mansuétude. Il n'y a que les révolutions qui exigent des changements complets de personnel, et il ne faudrait précisément pas de révolution, mais une administration qui, doucement, pacifiquement, deviendrait différente de traditions et de doctrines. Tel un train parti de Paris, y revient avec les mêmes wagons, mais d'autres denrées; elle pourrait aiguiller tout de suite. Son premier acte serait de donner la volée à tous ces alcools qu'elle retient captifs, et qu'elle n'ose pas délivrer, parce que, dans sa pensée, l'alcool n'est pas de l'alcool, c'est une matière qui doit à l'État 220 francs l'hectolitre. Cette dette l'hypnotise. Elle suit activement l'alcool libéré; elle poursuit avec une sorte de mauvaise humeur celui auquel il faut bien accorder ce qu'elle appelle un traitement de faveur. Quant à celui qui se dérobe avec ruses, et qu'elle atteint, c'est avec le

sentiment de Saussure, racontant sa première ascension au Mont-Blanc, « j'en foulai le sommet avec une colère satisfaite ». Il n'avait guère pensé qu'à ce moment depuis qu'il vivait.

L'administration des impôts logiques, que je rêve, la Logie, non plus la Régie, se délivrera donc, et nous délivrera aussi, de ces cauchemars, en disant d'abord à tous les alcools, consommés comme chauffage, éclairage et force motrice : « Passez : ce n'est plus une faveur que l'on vous fait, c'est une justice qu'on vous rend. Paix aux honnêtes commerçants qui vous additionnaient de méthylène, de benzine, de pétrole, d'acétone, de bases pyridiques, etc. Paix aux *dénatureurs* de l'alcool, Nous la leur donnons pour qu'ils nous la donnent à leur tour. Rendons-leur la justice de dire qu'ils faisaient très bien de la mauvaise besogne, qui nous donnait beaucoup de peine. Peu nous importe désormais, nous ne nous en mêlons plus. Le seul impôt qui puisse les atteindre est de l'ordre de ceux qui frappent le charbon et le pétrole, et sera perçu comme eux. » Et voilà une première bastille renversée.

Ce sera dans les mêmes sentiments que se fera, je pense, la séparation avec les bouilleurs de cru. Tout le monde à sa tâche allégée. Comme l'attrait des 220 francs d'impôt était certainement pour beaucoup dans l'augmentation de l'alcool de cette provenance, il est à prévoir que devant la menace de voir diminuer d'abord, puis finir la prime, les bouilleurs pourront se donner du loisir. L'administration de son côté n'aura plus la préoccupation du coulage et de la fraude : ce sera la trêve de Dieu. Une grande cause de dissensions intestines aura disparu du pays, et cet avantage de voir éteinte sans secousse une question irritante et insoluble est tel, qu'il vaut à lui seul le changement de système. Si les bouilleurs de cru se prétendaient lésés, il faudrait leur rappeler que leur besogne depuis dix ans a été illogique, illégale, et dangereuse, puisqu'elle a abouti à l'impasse dans laquelle nous nous débattons.

Mais laissons tout cela et plaçons-nous devant les faits. En fait, l'alcool des bouilleurs de cru ne peut-être séparé de l'alcool industriel, qui lui-même se confond, au point de vue fiscal, avec l'alcool de vin. A eux tous, c'est là la grande masse, celle qui rapporte, celle que le ministre des Finances ne perd pas des yeux. Comme la maladie du budget est aussi une maladie sociale, nous avons à nous demander ce qui est préférable : mourir de pléthore d'alcool ou d'épuisement financier. La réforme peut-elle se suffire à elle-même à ce point de vue? Laisse-t-elle un déficit et de combien ?

Libération de l'alcool.

Je dois avouer que j'ai été incapable de faire le petit calcul donnant un commencement de réponse à la question. J'aime à croire que les documents pouvant me le fournir sont publiés. On publie tant de tableaux de chiffres : les miens doivent en être; je n'ai pas réussi à les débrouiller. Je ne puis même pas dire à combien s'élève la principale économie que je fais, ce que coûte la partie du service des contributions indirectes qui s'occupe des alcools, et qui, dans ma pensée, n'y fait que du mal.

Je ne peux pas le dire, et là-dessus j'entends des gens qui crient : Qu'est-ce que c'est que cet olibrius, et que vient-il faire chez nous? Là-dessus, je réponds : « Vous seriez plus heureux que sages si, après les vingt ans de mauvaise politique que vous venez de nous faire, lorsque vous avez abouti à nous faire produire trop de sucre et trop d'alcool, lorsque vous avez créé les deux impasses qui se sont remplies l'une l'autre, car l'alcool de l'une est la mélasse de l'autre, si quelqu'un venait de vous dire : voici le moyen de sortir de vos embarras. Vous seriez plus heureux que sages si vous pouviez vous dire : nous avons manqué de prudence et d'esprit politique, mais ça ne fait rien, voilà un remède qui va opérer *cito, tuto, et jucunde,* pour nous débarrasser de notre engorgement. Eh bien, non, il n'en va pas ainsi. On a toujours de la peine à se tirer d'un mauvais pas, et si je suis intervenu, malgré mon incompétence, c'est qu'il m'a paru que je pouvais vous rendre le service, non pas de vous apporter de solution du problème, c'est au-dessus de mes forces, mais de vous montrer où il y en avait une. Je vous ai dit : vous vous êtes trompés par ignorance; voici un lot de vérités qui se tiennent, se commandent les unes aux autres. Prenez la logique qui s'y révèle comme base de votre réforme. Je la crois digne de présider, non seulement à la réfection de votre système d'impôts sur l'alcool, mais à la création d'une administration des impôts logiques, faite pour apparaître en France, et qui ne se bornera pas à l'alcool. Pratiquement, vous rencontrerez des difficultés, soyez en sûrs, mais on est armé contre elles quand on a un but et un programme.

Je ne vous dis pas ce que tout cela va vous coûter. Je ne le dis pas parce que je ne le sais pas. Mais il est facile de le savoir. Nommez une Commission, une Commission peu nombreuse et qui travaille. En tête, quelqu'un qui ait pris goût au projet. Pas moi, bien entendu! je suis trop vieux et trop incompétent, et je ne veux pas entrer dans une affaire sur laquelle je n'écrirai, je pense, plus un mot de ma vie. Mais il faut quelqu'un qui s'attache à ce projet avec la pensée de le faire sien, car le président de cette Commission aura plus de peine que

personne. A côté de lui, seulement quatre ou cinq inspecteurs des finances, gens habitués à réfléchir sur des documents précis, qui, sans être d'aucune administration, sont de toutes, ont par là une compétence générale savent lire les fictions au travers des réalités, et les réalités au travers des fictions. Ce sont les philosophes de notre système gouvernemental. Surtout qu'on ne pense pas à leur adjoindre des *gens du métier*, qui ne représentent d'ordinaire que des conventions.

Avec ces cinq ou six personnes, c'est assez pour le but à atteindre : découvrir dans les papiers officiels ce qu'il arrive d'argent provenant des diverses espèces d'alcools et constituer ainsi l'*Avoir* de la situation actuelle; faire son *Doit* avec tous les déboursés que comporte la réalisation de cet Avoir. Ceci sera, j'imagine, la po tion la plus facile de l'œuvre.

Il y en a une autre. Dans tout impôt, disait Bastiat, il faut compter ce qu'on voit et ce qu'on ne voit pas. C'est ce qu'on ne voit pas qui, à propos de l'alcool, est le plus intéressant. Dans la colonne du *Doit* il y a toutes les industries qui ont été chassées de France par l'exagération de nos droits, et toutes celles qui continuent à fonctionner chez nous, mais qui sont gênées dans leur expansion en France et à l'étranger par l'impôt qu'elles ont payé. Les renseignements sur ce point ne doivent point manquer. Les industries obligées de rester en France savent sûrement, à peu de chose près, ce que font d'affaires les maisons rivales et ce qu'elles gagneraient le jour où elles s'installeraient en France, n'ayant à payer que ce qu'on paye à l'étranger. Peut-être y aurait-il sur ces renseignements quelque ventilation à faire, mais des inspecteurs de finances sont en très bonne position pour cela. Ils pourraient citer, en outre, pour mémoire, s'ils le veulent, la paralysie partielle ou totale qui saisit tous nos industriels à la pensée qu'ils vont avoir affaire à la Régie. Ce n'est pas la moindre pièce à consulter quand on veut se faire une idée de l'atonie générale de l'industrie française.

Que ces messieurs, après avoir recueilli tous ces documents, veuillent bien les résumer dans deux pages d'un Grand-Livre, et on verra.

Je ne dis pas qu'on verra tout de suite que la réforme est mûre : tout ne s'écrit pas dans deux colonnes de chiffres. Notre tableau n'est pas complet, car nous n'y avons pas fait figurer ni chiffré les inconvénients et même les dangers de la situation actuelle. Nous avons suffisamment visé ce point, qui est surtout de l'ordre politique, et sur lequel je n'ai pas à insister. N'oublions pas que tout récemment le parti des bouilleurs de cru est devenu un parti dans l'État. Mais nous aurons une base pour discuter, et porter la question ainsi éclairée à la grande commission extraparlementaire de l'alcool, Celle-ci, avec toutes ses compétences spéciales, dira son mot qui sera le dernier. Le gouvernement agira ensuite.

Je lui ferai observer en terminant que, s'il veut, mais s'il veut bien, il a tout les atouts en main pour bien jouer la grosse partie qui se prépare. Sans attendre le rapport de sa commission des Inspecteurs des Finances, il peut, je crois, prévoir une économie de cinquante millions, assez pour gager tout de suite la libération de l'alcool-force, sur laquelle l'opinion publique est déjà faite et le parlement prêt à transiger. Offrez, comme prime, la disparition de la Régie, dont le travail sera semsiblement diminué dès le commencement de la réforme, si celle-ci se fait large, point regardante, et témoigne ainsi de l'apparition d'un esprit nouveau. Que l'on sente surtout que c'est le commencement d'une œuvre logique et scientifique, que vous mettrez, si vous voulez, dix ans à accomplir, mais que tout le monde comprendra dès l'abord, et vous verrez la joie des intéressés, beaucoup plus nombreux que vous ne le pensez vous-même. Ainsi votre réforme des alcools entrera noblement dans cette série de réformes qui ont eu pour objet la libération du pain, du vin, du sucre. Ce jour-là l'alcool sera remonté à sa place au point de vue de l'impôt, car il est bien réellement l'aliment de tous.

J'ai fini, et je sens que j'aurais encore beaucoup à dire. C'est le propre des questions bien prises qu'elles s'allongent sous les doigts. J'ai voulu ne parler que de l'alcool-aliment. J'aurais pu enfiler le chapitre de l'alcool-force, sur lequel je compte pour faire éclater le cercle de fer de nos idées étroites sur l'alcool. J'aurais pu y ajouter ou plutôt y commencer la question de l'alcool-nourriture des animaux de la ferme, qui promet un nouveau débouché pour tous nos excédents d'alcool et rendra très évidemment inutile l'administration des contributions indirectes. J'aurais voulu aborder, autrement qu'en lui fournissant un programme d'enseignement, la question de l'alcoolisme, si différente de la question de l'alcool, et qui est sociale. Mais j'ai, je crois, heurté beaucoup de préjugés et soulevé assez de colères. Ce sera pour une autre fois.

E. Duclaux.

Le Gérant : G. Masson.

Sceaux. — Imprimerie Charaire.

17me ANNÉE DÉCEMBRE 1903 N° 12

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

Études expérimentales sur la Syphilis

PAR
EL. METCHNIKOFF ET EM. ROUX

PREMIER MÉMOIRE
(Avec les planches XVI et XVII).

Dans l'état actuel de nos connaissances et de nos mœurs, la syphilis est pour l'homme un véritable fléau contre lequel il serait fort utile de trouver de nouvelles armes.

Or, jusqu'à présent on ignore la nature de l'agent de cette maladie, et on manque de notions suffisamment précises sur un grand nombre de questions touchant à la pathogénie et à l'immunité de la syphilis.

Autrefois, lorsqu'on ignorait certaines conséquences tardives et très funestes de la syphilis, et lorsqu'on pensait que cette maladie était sûrement curable par les méthodes classiques, on l'inoculait souvent à des êtres humains dans le but d'éclaircir certains points de son histoire. A présent, ces inoculations ne sont plus possibles, tellement leur danger est évident. Aussi a-t-on cherché quelque espèce animale sensible au virus syphilitique.

Il existe toute une littérature sur les tentatives faites pour communiquer la syphilis à des vertébrés de différentes classes. On a inoculé le virus syphilitique à des animaux à sang froid, tels que grenouilles et salamandres (Brieger et Uhlenhut), ainsi qu'à différentes espèces d'oiseaux et surtout aux mammifères. Dans la très grande majorité des cas, les résultats ont été

infructueux. On trouve pourtant de temps en temps l'annonce que des animaux d'expérience ont contracté des lésions syphilitiques plus ou moins nettes. Auzias-Turenne[1] affirme avoir obtenu, en 1866, des papules syphilitiques et des plaques muqueuses chez un chat. Une année plus tard, en 1867, Legros et Lancereaux ont décrit des lésions syphilitiques chez un cobaye inoculé avec un fragment de chancre induré[2].

Parmi les mammifères inférieurs, l'espèce porcine a surtout servi à des expériences nombreuses d'inoculation du virus syphilitique. D'après nos renseignements, c'est Martineau[3]. qui, le premier, a attribué au cochon la propriété de contracter la syphilis expérimentale. Après avoir inoculé à un jeune porc du pus, provenant d'un chancre syphilitique, il a observé le développement d'une induration parcheminée au point d'inoculation, suivie de l'apparition de papules nombreuses sur les différentes parties du corps.

Plus tard, Adrian[4], ainsi que Hügel et Holzhauser[5], ont publié des résultats positifs de transmission du virus syphilitique à des cochons qui contractèrent des exanthèmes, présentant des caractères de papules spécifiques. Neisser[6], à Breslau, a voulu se renseigner par des expériences personnelles sur la valeur de ces affirmations. Sur 18 cochons inoculés dans des conditions très diverses, il n'a obtenu qu'une seule fois un exanthème circiné qui présentait une analogie avec des accidents syphilitiques secondaires, mais qui, au point de vue histologique, en différait notablement.

Les tentatives sur les mammifères les plus divers n'ayant pas donné de résultats constants ni satisfaisants, on s'est mis à inoculer le virus syphilitique à des singes, à cause de leur affinité zoologique avec l'espèce humaine. Sans parler des expériences faites à l'époque où on ne savait pas encore suffisamment distinguer le chancre syphilitique du chancre simple, nous résumerons en quelques lignes les recherches plus récentes, exécutées sur des singes.

A notre connaissance c'est Klebs[7] qui, le premier, inocula

1. *La Syphilisation*, 1878, p. 422.
2. Cité dans le *Dictionnaire encyclop. d. sciences médic.*, 1884, t. XIV, p. 498.
3. *Ibid.*, p. 499.
4. *Archiv. f. Dermatologie u. Syphilis*, t. XLVII, p. 163.
5. *Ibid.*, t. LI, 1900, p. 225.
6. *Ibid.* t. LIX, 1902.
7. *Archiv. für experimentelle Pathologie*, 1879, t. X., p. 161.

dans la peau d'une guenon des fragments de chancre syphilitique, et qui observa, six semaines plus tard, une éruption papuleuse sur plusieurs parties du corps. Quelques années après Klebs, Martineau et Hamonic[1] inoculèrent en 1882 un « singe macaque » qui présenta, quatre semaines après l'inoculation, deux chancres indurés sur le prépuce, et chez lequel les deux expérimentateurs ont décrit l'apparition consécutive de syphilides, de l'adénopathie, d'ulcérations de la voûte palatine et du voile de palais.

Malgré les résultats positifs, annoncés par les auteurs que nous venons de nommer, leurs travaux n'ont pas eu de suite. Cela provient peut-être de ce qu'ils n'ont pas indiqué d'une façon précise quelle espèce de singes ils ont employé dans leurs expériences. Il existe un très grand nombre d'espèces de macaques qui se comportent différemment vis-à-vis du virus syphilitique, de sorte que la simple désignation « singe macaque » reste absolument insuffisante. Aussi, plusieurs observateurs, ayant inoculé à des singes des produits syphilitiques, n'ont obtenu que des résultats nuls ou insignifiants. Ainsi, Sperk[2] a inoculé en 1886 et en 1888 en tout 46 singes de différentes espèces, et sur ce grand nombre d'expériences, il n'a réussi que très peu de fois. Un « singe macaque mâle », après avoir été inoculé par scarification au prépuce avec le produit d'une papule syphilitique, présenta 21 jours après une érosion qui se transforma en un ulcère, semblable au chancre induré. Un mois plus tard, il se produisit une éruption de boutons. Avec l'ulcère de ce singe, Sperk a obtenu chez un autre macaque mâle une ulcération chancriforme qui n'a guéri qu'après environ trois mois. Chez un troisième macaque, inoculé avec l'ulcère du second, il se développa 14 jours plus tard une papule ulcérée qui ne se cicatrisa que 52 jours après son apparition.

A la même époque, Mossé[3], à Montpellier, inocula une jeune guenon avec les produits d'un chancre syphilitique et d'une plaque muqueuse. Le résultat a été négatif. Beaucoup d'autres chercheurs n'ont pas été plus heureux et, en présence de leur échec, ils n'ont même pas cru utile de publier leurs tentatives.

1. *Bulletin de l'Acad. de méd.*, 1882, p. 1007; *Soc. med. d. Hôpitaux*, 1883; *Revue clinique d'Andrologie et de Gynécologie*, 1903, p. 225.

2. *Œuvres complètes*, t. II, Paris, 1896, p. 614-616.

3. *Gazette hebdomad. d. sciences méd. de Montpellier*, 1887.

Ainsi, ce n'est que tout récemment que les docteurs Krishaber, A. Fournier et Barthélemy[1] ont fait savoir qu'en 1882 ils avaient pratiqué un grand nombre d'inoculations de produits syphilitiques à des macaques, sajous, cynocéphales, ouistitis et autres singes.

« Quant aux résultats que nous ont fournis ces diverses expériences, — disent les observateurs cités, — ils se résument en ce seul mot : *rien* » (p. 216). Nous avons eu connaissance d'autres expériences, sur des singes, exécutées dans des laboratoires de Paris, de Breslau et de Saint-Pétersbourg, et qui n'ont pas eu plus de succès.

Après un si grand nombre de résultats négatifs, nous devons mentionner les expériences de Maurice Nicolle, faites en 1893 à l'Institut Pasteur. Entre les mains de ce savant, certains singes se sont montrés absolument réfractaires à la syphilis; mais une espèce de macaque a contracté, à la suite de l'inoculation du virus à l'arcade sourcilière, des papules caractéristiques. Ces expériences, dont M. Nicolle nous a fait la démonstration à l'époque, n'ont pas été publiées. Mais plus récemment le docteur Ch. Nicolle les a reprises, et a établi que l'espèce de macaques qui présente une certaine sensibilité pour le virus syphilitique est le Bonnet chinois (*Macacus sinicus*), dont trois individus ont été inoculés avec succès. Ils ont présenté au point d'introduction du virus, dans l'espace de 15 à 19 jours après l'inoculation, des papules squameuses qui ont guéri rapidement (de 10 à 23 jours). Une fois seulement il s'est produit un noyau sous-cutané induré, accompagné d'adénopathie. Mais chez aucun des trois singes il n'a été observé d'accidents ultérieurs, correspondant aux symptômes secondaires de la syphilis.

Tout récemment Hamonic[2] a communiqué à l'Académie de médecine une expérience, dans laquelle un macaque japonais (*M. cynomolgus*) a présenté des ulcérations indurées accompagnées d'adénopathie, ulcérations qui, 9 jours après leur apparition, ont commencé à guérir.

On peut conclure de toutes ces données qu'en général les singes possèdent une immunité naturelle vis-à-vis de la syphilis, mais que cependant, chez quelques espèces, peuvent se produire

1. *La Syphilis*, 1903, t. I, p. 209.
2. *Revue cl. d'Androl. et de Gynécol.* 1903, p. 326.

certaines manifestations syphilitiques, beaucoup moins prononcées toutefois que chez l'homme.

Nous-mêmes, nous avons inoculé plusieurs macaques bonnets chinois (*Macacus sinicus*) avec du virus syphilitique, et nous avons pu confirmer les faits observés par MM. Nicolle. Environ 20 jours après l'inoculation à la peau, il se développe des papules au point d'introduction du virus ; elles sont entourées d'œdème et se couvrent de croûtes qui tombent au bout de quelques temps. Les ganglions lymphatiques du voisinage ne sont pas perçus à la palpation, ou bien donnent la sensation de petites glandes pas plus grosses que des graines de millet. La courte durée de l'accident primaire, ainsi que l'absence de manifestations secondaires, indique une faible sensibilité du bonnet chinois pour la syphilis. Un certain nombre de ces singes se montrent même complètement réfractaires au virus. Ainsi, sur 5 bonnets chinois que nous avons inoculés, 2 seulement ont présenté les accidents décrits, tandis que les 3 autres n'ont rien montré du tout.

Un jeune mandrill mâle (*Cynocephalus mormon*), que nous avons inoculé avec de la sérosité provenant d'un chancre syphilitique, s'est également montré réfractaire pendant les 2 mois qu'a duré l'expérience.

Dans l'ordre des primates, à côté des macaques et des cynocéphales, il existe tout un groupe de singes anthropoïdes. Nous avons supposé que ces derniers, à cause de leur affinité beaucoup plus grande avec l'espèce humaine, seraient plus sensibles au virus syphilitique.

L'anatomie comparée nous apprend que sous tous les rapports les singes anthropoïdes se rapprochent plus de l'homme que des singes proprements dits. Ce résultat, formulé surtout par Huxley, a été dans ces derniers temps confirmé par Grünbaum et Nuttall, à la suite de leurs recherehes sur les propriétés hémolytiques, agglutinatives et précipitantes des sérums. Ils ont établi que le sérum des animaux, préparés avec du sang humain, manifeste vis-à-vis du sang et du sérum d'homme les mêmes propriétés que vis-à-vis du sang et du sérum des singes anthropoïdes (chimpanzé, gorille, orang-outan).

Partant de ces données, nous avons cherché à donner aux singes anthropoïdes des maladies infectieuses propres à l'espèce

humaine. Jusqu'à présent nous n'avons pu nous procurer que des chimpanzés (*Troglodytes niger* et *Tr. calvus*), auxquels nous avons inoculé du virus syphilitique.

Notre première expérience a été faite sur un chimpanzé femelle, âgée de deux ans environ. Nous lui avons inoculé d'abord, par scarification épidermique, au prépuce clitoridien, un peu de sérosité, prise sur un chancre induré d'homme. Cette lésion, datant d'un mois, était déjà en voie de guérison et présentait l'aspect cartilagineux d'un chancre du sillon balano-préputial. L'individu qui nous avait fourni le virus était atteint d'adénopathie sous-maxillaire et était porteur d'une roséole très nette. Il n'avait subi aucun traitement interne, mais appliquait localement de l'eau oxygénée.

Dans la même séance, notre chimpanzé reçut une seconde inoculation sur le rebord sourcilier du côté droit, au moyen d'un peu de sérosité retirée d'une plaque muqueuse chez un individu porteur d'une cicatrice récente d'un chancre induré de la verge, et atteint depuis 3 semaines de 3 ulcérations syphilitiques du même organe. Ce malade n'avait pas plus que le premier subi de traitement général, mais il lavait les parties malades avec de l'eau boriquée.

Ces deux inoculations ayant été faites avec un virus de syphilis déjà avancée, dont les lésions avait été traitées par des antiseptiques, nous avons cru utile de soumettre notre chimpanzé 5 jours plus tard à une troisième inoculation. Cette fois nous nous sommes servi du raclage d'un chancre induré de la verge, âgé seulement de 3 jours et n'ayant subi aucun traitement. L'inoculation fut pratiquée dans le pli du prépuce clitoridien du côté gauche.

Les petites portes d'entrée du virus se sont fermées au bout de peu de temps, sans donner lieu à aucune lésion. Les 3 premières semaines après l'inoculation, se sont passées sans le moindre accident, et ce n'est que le 26e jour après l'introduction du virus que nous avons aperçu, du côté droit du prépuce clitoridien, à l'endroit de la première inoculation, une petite vésicule ovale, transparente, entourée d'une zone rougeâtre qui ne tranchait pas brusquement sur les parties voisines. Bientôt la vésicule s'est aplatie, s'est transformée en une érosion enfoncée au milieu d'un tissu qui tous les jours devenait de plus en plus

induré. Le fond du chancre se présentait sous forme d'une plaque arrondie de couleur d'ocre (fig. 1, pl. XVI); mais, au bout de peu de temps, l'érosion s'était couverte d'une fausse membrane grise avec des contours très marqués.

Il a été bien constaté qu'au moment de l'inoculation le chimpanzé ne présentait pas de ganglions lymphatiques tant soit peu marqués. Mais, au début de la lésion locale, on pouvait sentir des petits ganglions aux aines des deux côtés. Quelques jours plus tard on percevait une hypertrophie très marquée de ces ganglions du côté droit correspondant au chancre. On pouvait distinguer nettement un paquet, composé de quatre ganglions. De même que les trois ganglions de l'aine gauche, plus petits, ils n'étaient aucunement douloureux, lorsqu'on les touchait ou qu'on les pressait même fortement.

Vers cette époque, c'est-à-dire 20 jours après l'apparition de la vésicule initiale du prépuce, nous avons montré notre chimpanzé à l'Académie de médecine, afin que les membres de cette Compagnie pussent vérifier le résultat de notre première expérience [1]. Tous les membres présents qui ont examiné l'animal ont constaté le caractère syphilitique de la lésion, et des spécialistes, parmi lesquels nous citerons M. le professeur A. Fournier, MM. du Castel, Hallopeau, Marc Sée, ont fait le diagnostic de chancre induré.

Le lendemain de la séance, M. Méheux, photographe spécialiste bien connu, a pris la photographie de l'accident primaire que nous avons fait reproduire sur la planche XVI. Le chancre se trouvait alors en pleine évolution.

Juste un mois après l'apparition du chancre, c'est-à-dire 56 jours après la première inoculation, nous avons pu remarquer sur la peau blanche de notre animal quelques papules, disséminées sur les faces ventrale et dorsale, ainsi que sur les cuisses. Au début nous n'avons pu trouver que 4 papules, mais leur nombre s'est accru jusqu'à 15 les jours suivants.

Ces papules présentaient les caractères de papules squammeuses, sèches. Elles étaient rondes, de grandeur un peu différente, et laissaient distinguer une zone périphérique rouge et une partie centrale sous forme de croûte. Il suffisait de gratter un

1. *Bulletin de l'Académie de médecine*, 1903, 28 juillet.

peu la surface, pour provoquer le suintement d'une sérosité rose et légèrement louche.

Avec le temps ces papules accusèrent de plus en plus leur analogie avec les productions analogues chez l'homme syphilitique. Entre la zone périphérique et la croûte s'était développé un anneau plus étroit, formé de petites squames blanchâtres, et constituant ce que l'on désigne sous le nom de « collerette de Biett ».

Vingt jours après l'apparition des premières syphilides, les signes caractéristiques de ces papules étaient très manifestes, et c'est alors qu'ont été prises par M. Méheux les photographies reproduites sur les figures 4 et 5 de la planche XVII. A ce moment le chancre, bien qu'encore conservé, présentait des signes incontestables de guérison. Les tissus environnants sont devenus moins hypérémiés et plus flasques; la partie centrale s'est transformée en une croûte sèche et dure.

La période de réparation du chancre a commencé quelques temps après que les accidents étaient le plus développés. La zone périphérique de rouge est devenue pâle et de plus en plus imprégnée de pigment noir ou brun foncé. L'induration des papules a disparu complètement, et ces syphilides se plissaient facilement lorsqu'on les touchait.

Dans la cavité buccale on pouvait distinguer des ulcérations variées, mais il a été impossible de les rattacher d'une façon certaine à la syphilis. Chez les chimpanzés en captivité, il se développe le plus souvent une gingivite opiniâtre, et c'est pour cela qu'on n'ose pas attribuer aux lésions buccales le caractère spécifique. Par contre, l'adénopathie généralisée, développée chez notre animal, pouvait être avec plus de droit considérée comme une manifestation syphilitique. En dehors des ganglions des aines déjà mentionnés, il a été possible de suivre l'hypertrophie des ganglions des aisselles. En outre, pendant la période du développement des accidents secondaires, la rate a présenté une augmentation de volume et s'est montrée dure à la palpation.

Environ trois mois après le début de l'expérience, notre chimpanzé a commencé à manifester des symptômes de malaise. On le trouvait souvent couché dans sa cage. L'animal mangeait et buvait avec moins d'appétit et maigrissait à vue

d'œil. Cet état a duré pendant une quinzaine de jours avec des hauts et des bas successifs, mais finalement la santé s'est altérée d'une façon très grave. Le singe restait couché toute la journée, ne prenait presque aucun aliment et s'affaiblissait de plus en plus. Les derniers jours il toussait un peu, mais ne se plaignait point.

Soixante-dix-neuf jours après le début du chancre et 49 jours après l'apparition des premières syphilides, notre animal a été trouvé mort. Son cadavre ne pesait que 4,600 grammes. A l'autopsie, on a trouvé les ganglions des aines augmentés de volume, ceux du côté droit étaient beaucoup plus gros que ceux de l'aine gauche. La rate, qui pesait 40 grammes, était visiblement hypertrophiée et dure ; elle était de couleur rouge foncé et présentait un grand nombre de corps de Malpighi très distincts. Le foie était volumineux (275 grammes), pâle, de couleur jaunâtre. Sa surface montrait plusieurs bosselures. Les reins, anémiés, avaient une couche corticale très développée. Le poumon gauche était faiblement œdémateux et un peu congestionné. Dans la cavité buccale, on apercevait autour des dents de la mâchoire supérieure quelques plaques de nécrose. L'épiglotte était hypérémiée et l'entrée du larynx d'un rouge intense.

Le sang du cœur, le foie, la rate et le poumon, ensemencés sur des milieux de culture, ont donné le lendemain une abondante récolte de pneumocoques soit isolés, soit en petites chaînettes. Il faut donc admettre que le chimpanzé est mort d'une pneumococcie généralisée, dont la porte d'entrée s'est faite par les ulcérations de la bouche.

Cette fin prématurée de notre animal a interrompu l'expérience, qui a donné tout de même quelques résultats dignes d'intérêt. Elle a montré que le chimpanzé est de beaucoup plus sensible au virus syphilitique que les singes proprement dits, et que chez lui la syphilis évolue d'une façon comparable à la syphilis de l'homme. En outre de l'accident primitif, long à guérir, il se développe chez le chimpanzé des manifestations syphilitiques secondaires, sous forme de syphilides papulo-squameuses. D'un autre côté, cette première expérience a prouvé que le chancre induré d'homme, quoique étant en voie de guérison et âgé d'un mois, renferme encore assez de virus actif pour provoquer

la syphilis chez le chimpanzé. En troisième lieu, il découle de notre expérience que l'immunité vis-à-vis de l'accident primitif s'établit avec une grande rapidité. Des trois inoculations successives, il n'y a que la première qui ait donné un résultat positif. La seconde inoculation, pratiquée 5 jours après la première, avec un virus probablement plus fort, n'a été suivie d'aucune manifestation. On peut en conclure que cette immunité est déjà acquise en peu de jours.

Dans le but d'établir si la syphilis du chimpanzé était capable de se transmettre à d'autres individus du même genre, nous avons inoculé à un chimpanzé mâle (*Troglodytes calvus*) des produits syphilitiques du premier animal. 45 jours après l'apparition du chancre induré chez celui-ci, c'est-à-dire à une période où cette lésion syphilitique était en voie de guérison manifeste, nous avons prélevé un peu de sérosité que nous avons inoculée à la verge de notre second animal. Comme dans la première expérience, l'inoculation a été tout à fait superficielle et pratiquée avec le scarificateur de Vidal.

Nous avons pensé qu'un chancre aussi avancé dans son évolution et prêt à guérir pouvait peut-être avoir déjà perdu de sa virulence. Pour cette raison, nous avons en même temps inoculé un peu de raclage, prélevé à une syphilide papuleuse du premier chimpanzé, à la cuisse gauche de notre second animal d'expérience.

Les premiers jours après ces deux inoculations, on n'observa rien de particulier, les petites lésions occasionnées par le scarificateur s'étant fermées au bout de peu de temps. Mais 8 jours après, nous avons constaté à la cuisse gauche deux petites ulcérations passagères. Après quoi, pendant toute une période consécutive, nous ne pouvions apercevoir aucun symptôme morbide. Ce n'est que 35 jours après l'inoculation qu'est apparue du côté gauche de la verge une petite érosion superficielle. Elle avait la largeur d'une petite lentille et ne présentait ni rougeur ni induration. Mais les jours suivants la lésion a progressé notablement. Elle est devenue plus grande et s'est allongée. Au même moment, il se développa sur la cuisse inoculée une seconde érosion, entourée d'un tissu légèrement induré. Les ganglions lymphatiques étaient palpables dans les deux aines.

Les jours suivants, la lésion de la verge a fait des progrès considérables. En même temps l'accident primaire de la cuisse s'est ulcéré dans sa partie centrale; la rougeur et l'induration sont devenues très prononcées et le tout a pris l'aspect caractéristique d'un chancre superficiel de la peau. Les ganglions de l'aine du côté correspondant aux lésions de la verge et de la cuisse se sont notablement hypertrophiés; on pouvait y distinguer nettement deux ganglions mobiles, indolores et durs.

Un mois après son apparition, le chancre de la cuisse a commencé à rétrograder, tandis que celui de la verge a continué à progresser. Les ganglions lymphatiques de l'aine gauche ont pendant ce temps encore augmenté de volume. Cette hypertrophie cependant ne s'est pas maintenue et dans la suite les ganglions ont sensiblement diminué de grosseur. Environ 6 semaines après son apparition, le chancre de la cuisse a commencé à guérir, celui de la verge est au contraire resté sans changement jusqu'à la mort de l'animal, survenue 45 jours après le début des manifestations syphilitiques.

Les deux dernières semaines de sa vie, le chimpanzé souffrait de rhume et toussait fréquemment. L'appétit et les forces diminuèrent progressivement et l'animal finit par succomber. Sur le cadavre on pouvait apercevoir à la verge le chancre induré très typique. Les restes du chancre de la cuisse se sont montrés entourés d'une zone large pigmentée et renfermant au centre une squame sèche, dure et épaisse. Il n'a été possible de constater aucun accident secondaire. A l'autopsie, la rate a été trouvée adhérente au péritoine; le foie et les reins étaient pâles, de couleur jaunâtre. L'estomac et l'iléon accusaient quelques légères ulcérations. Les poumons n'ont présenté rien d'anormal. Le sang du cœur, ensemencé sur gélose, a donné une culture très abondante d'un petit coccobacille qui ne prend pas le Gram et qui présente une certaine ressemblance avec le coccobacille de Pfeiffer, isolé des cas d'influenza. Mais les deux microbes ne sont pas identiques, car celui du chimpanzé pousse bien sur gélose ordinaire, non additionnée de sang.

L'expérience que nous venons de relater nous a fourni une nouvelle preuve de la sensibilité du chimpanzé pour le virus syphilitique. Elle nous a montré en outre que la syphilis est capable de se transmettre d'un chimpanzé à l'autre et que le

virus du chancre est aussi capable de provoquer l'accident primaire que celui d'une syphilide papulo-squameuse. Mais tandis que le virus du chimpanzé a développé le chancre chez un second individu du même genre, il est resté sans effet sur un jeune mandrill. De même, le raclage du chancre de la cuisse de notre second chimpanzé, inoculé à la région sourcilière d'un *Macacus sinicus*, n'a rien produit. Ce fait indique peut-être une certaine atténuation du virus syphilitique après son passage à travers l'organisme du chimpanzé. Ce résultat devra être contrôlé par des recherches ultérieures que nous sommes en train de poursuivre.

Les faits que nous avons pu établir dans ce mémoire découlent de nos recherches qui ne sont qu'à leur début, ils montrent néanmoins qu'une contribution utile à l'étude de la syphilis peut être fournie par l'expérimentation sur les animaux, et notamment sur les singes anthropoïdes. Chez ces derniers, l'évolution de la maladie présente en effet la plus grande analogie avec la syphilis humaine.

Les recherches dont nous avons esquissé une première partie n'ont pu être exécutées que grâce à de nombreux concours. Aussi nous exprimons notre reconnaissance aux syphiligraphes qui ont voulu à plusieurs reprises examiner nos animaux, notamment à MM. le professeur A. Fournier, du Castel, Hallopeau et Danlos. Nous remercions également MM. les docteurs Salmon et Queyrat, qui nous ont fourni le matériel nécessaire pour les inoculations, et qui nous ont aidé dans l'examen de nos animaux d'expérience. Nous devons aussi nos remerciements à l'Institut de France et au Quatorzième Congrès international de Médecine à Madrid pour les prix (Osiris et de Moscou) qu'ils nous ont accordés, et qui nous ont permis d'entreprendre ces expériences très coûteuses, ainsi qu'à la direction du Jardin des Plantes de Paris et à M. Gazengel, pour le don du chimpanzé mâle, dont nous avons relaté l'histoire.

EXPLICATION DES FIGURES

Planche XVI. Fig. 1. Partie postérieure du corps du chimpanzé femelle, avec le chancre induré de la vulve. 21e jour après l'apparition. On voit bien la proéminence de la peau de l'aine droite qui recouvre le paquet ganglionnaire.

Planche XVII. Fig. 2. Lésion primaire, prise le 8e jour après le début.

Fig. 3. La même, avec le clitoris écarté.

Fig. 4. Lésion primaire en voie de guérison, ainsi que deux syphilides papulo-squammeuses.

Fig. 5. Une syphilide papulo-squammeuse de la partie dorsale du chimpanzé.

RECHERCHES SUR LA COAGULATION DU SANG

PAR LES Drs JULES BORDET ET OCTAVE GENGOU

(DEUXIÈME MÉMOIRE)

(Travail de l'Institut Pasteur de Bruxelles.)

Nous avons attiré l'attention, dans un travail antérieur [1], sur une propriété intéressante du plasma obtenu par la méthode des tubes paraffinés. Le point de départ de ces recherches était l'observation bien connue de Freund, d'après laquelle le sang recueilli, au sortir du vaisseau, dans un vase dont les parois sont enduites d'huile ou de vaseline, ne se coagule qu'avec une extrême lenteur. Dans le but d'obtenir du plasma, nous tentâmes tout d'abord de centrifuger, sans qu'il se coagulât, du sang contenu dans un tube intérieurement vaseliné. Mais la vaseline étant trop molle, se détachait du verre sous l'action de la force centrifuge. Nous eûmes recours alors à des tubes dont les parois intérieures étaient recouvertes d'une couche de paraffine solide. Dans ces conditions il nous fut facile d'obtenir, par centrifugation et décantation, du plasma bien débarrassé d'éléments cellulaires, et qui ne se coagulait qu'avec une lenteur tout à fait inusitée (parfois au bout de 4 à 5 heures, parfois seulement au bout de 24 à 30 heures). Mais il était indispensable, pour conserver à l'état liquide ce plasma limpide et privé de cellules, *de ne point lui faire subir d'autre contact que celui de la paraffine.* Nous constatâmes en effet, qu'un tel plasma, susceptible de rester liquide pendant un temps fort prolongé à condition d'être maintenu en tube paraffiné, se coagulait très rapidement lorsqu'on le transvasait dans un tube non paraffiné ou qu'on le versait sur une plaque de verre; on observait alors que la

1. Recherches sur la coagulation du sang. Ces *Annales*, 1901. Les expériences relatées dans le présent mémoire ont fait l'objet d'une note transmise récemment à l'Académie royale de médecine de Belgique.

surface du verre se tapissait rapidement d'une couche de fibrine, d'abord très mince, adhérant à la paroi, et qui peu à peu s'épaississait, la coagulation se propageant à toute la masse du plasma.

Comme il s'agissait de plasma ne contenant en suspension aucune espèce d'élément cellulaire, notre conclusion fut non seulement que le contact avec un corps tel que le verre accélère la coagulation du sang (ce qu'on savait depuis longtemps), mais encore que cette influence favorisante peut s'exercer sur les substances inorganisées du plasma, dans des conditions où toute participation d'une sensibilité ou irritabilité cellulaire est formellement exclue. Il s'agit ici d'un phénomène non pas biologique, mais physico-chimique; l'influence qui intervient est vraisemblablement l'adhésion moléculaire, la paraffine se distinguant du verre en ce qu'elle n'est pas mouillée par le plasma.

Si l'on verse du plasma dans un verre de montre enduit de paraffine, on remarque que les poussières de l'air (débris d'étoffe, poils de laine, etc.) tombant sur la surface du liquide s'entourent bientôt d'une zone de coagulation, qu'il est facile de déceler au moyen de petits tubes capillaires dont on met l'orifice en contact avec la surface du plasma. Si l'on fait toucher par l'extrémité du capillaire un point très voisin de celui où flotte depuis quelque temps une poussière, on s'aperçoit que le plasma ne s'élève pas dans le tube, tandis qu'en d'autres endroits de semblables tubes capillaires se remplissent dès qu'ils piquent le liquide. Comme celui du verre ou des poussières, le contact du platine favorise la coagulation.

Tels sont les faits relatifs au rôle du contact dans la coagulation, que nous avons exposés dans notre précédent mémoire. Il nous a paru opportun de les soumettre à une étude plus approfondie, qui fait l'objet du présent article.

§ I. Role du contact dans la production du fibrin-ferment.

Nous ne nous proposons point d'aborder ici la question de l'origine cellulaire des substances actives qui président à la coagulation, qui, en d'autres termes, font passer le fibrinogène à l'état de fibrine solide. Nous considérerons exclusivement

des plasmas limpides, débarrassés par une centrifugation prolongée, de tout élément cellulaire.

On sait que le sang circulant ne renferme pas le principe coagulant actif (Schiff). Le sang qui jaillit du vaisseau n'en contient pas dans les premiers instants. Mais bientôt ce principe apparaît, provoque la coagulation, et se retrouve dans le sérum exsudé du caillot. M. Arthus a étudié très soigneusement la marche de la production *in vitro*, du fibrin-ferment dans le sang que l'on vient d'extraire.

On sait aussi qu'on peut obtenir des plasmas incoagulables spontanément, et qui ne contiennent pas de fibrin-ferment. Tel est le plasma oxalaté obtenu d'abord par MM. Arthus et Pagès. Si ce plasma contenait du fibrin-ferment, il se transformerait en caillot ; en effet Pekelharing a montré que du plasma oxalaté coagule par l'addition de sérum provenant d'une coagulation normale antérieure, même si se sérum a été, avant d'être mélangé au plasma, additionné d'oxalate[1]. Il en résulte non seulement que le plasma oxalaté ne contient pas le principe coagulant dont le sérum est abondamment pourvu (fibrin-ferment), mais encore que la présence d'oxalate n'empêche pas ce ferment de transformer le fibrinogène en fibrine.

Mais le plasma oxalaté, même complètement privé de cellules, présente ce caractère, signalé par Arthus et Pagès, de se coaguler rapidement quand on y introduit un sel soluble de calcium en quantité légèrement supérieure à celle qui suffit à précipiter complètement l'oxalate. Le sérum qui s'exsude du caillot formé contient du fibrin-ferment, car, additionné d'oxalate en excès, il provoque la coagulation du plasma oxalaté. L'addition de sel calcique au plasma oxalaté y fait donc apparaître le fibrin-ferment ; on est bien forcé d'admettre, naturellement, que celui-ci se forme aux dépens d'une matière préexistante, génératrice du fibrin-ferment, et qui a été dénommée *proferment*. On est donc autorisé à dire que le plasma oxalaté renferme du proferment ; celui-ci exige, pour se transformer en ferment actif, l'addition de sels de chaux ; dès que le ferment est produit, la présence de chaux n'est plus indispensable à la coagulation.

1. Rappelons que l'oxalate alcalin s'emploie dans ces expériences à dose de 1 0/00 environ.

L'opinion généralement acceptée est que le pouvoir anticoagulant des oxalates est dû uniquement à ce que ces sels insolubilisent le calcaire, la présence du calcium soluble étant une condition nécessaire à la production même du ferment coagulant aux dépens du proferment.

Toutes ces notions, on le sait, résultent surtout des remarquables travaux de Arthus et Pagès, Pekelharing, Hammarsten.

Nous emploierons donc le langage généralement usité, et nous dirons qu'un liquide renferme du fibrin-ferment lorsque, additionné d'oxalate, il est capable de coaguler le plasma oxalaté. Nous dirons qu'il renferme du proferment lorsque du fibrin-ferment peut y prendre naissance dès qu'on fait intervenir certaines influences.

***

Pour ce qui concerne le rôle du contact, nous devions évidemment nous poser la question suivante : Pourquoi le plasma limpide, que l'on obtient en centrifugeant du sang de lapin recueilli directement au sortir du vaisseau dans des tubes paraffinés, pourquoi ce plasma privé de cellules et qui reste longtemps liquide dans les tubes paraffinés, se coagule-t-il si vite en présence de corps mouillables tels que le verre? Que fait le contact du verre? Accélère-t-il la production du fibrin-ferment, ou bien favorise-t-il l'activité coagulante de ce dernier? En d'autres termes, dans le plasma liquide maintenu en tube paraffiné, l'absence de coagulation est-elle due à ce que le fibrin-ferment ne se produit pas (c'est-à-dire à ce que le proferment ne se transforme pas en ferment actif), ou bien à ce que ce principe apparaissant, son influence est paralysée pour une raison quelconque?

A vrai dire, il n'était pas commode, pour résoudre ce problème, de recourir à la technique mentionnée plus haut, et qui consiste à recueillir directement le sang de lapin, au sortir de l'artère, dans des vases paraffinés, en évitant tout contact autre que celui de la paraffine. Cette technique est d'exécution assez difficile; en outre, le plasma qu'on peut obtenir ainsi finit toujours par se coaguler au bout d'un certain nombre d'heures, fort sujet à varier, du reste, de telle sorte qu'on n'a guère le temps d'utiliser un même plasma pour plusieurs expériences. Il fallait donc procéder autrement; aussi avons-nous eu recours

à un plasma dont nous avons attentivement étudié les propriétés et qui est le plasma chloruré sodique.

Préparation et caractères du plasma salé. — On le sait, Hewson, Denis, Schmidt, ont montré que le sang ne se coagule pas lorsqu'on le recueille, au sortir du vaisseau, dans une solution de NaCl suffisamment concentrée pour que la teneur du sang en sel s'élève à 5 0/0 environ[1]. Par centrifugation, on obtient du plasma qui conservé tel quel, reste indéfiniment liquide, mais qui se coagule bientôt si on l'additionne d'eau distillée en quantité assez grande pour abaisser la teneur saline à 1 0/0 environ, la teneur en chlorure redevenant alors assez voisine de celle qu'on observe dans le sang normal.

Nous basant sur ces données, nous préparions généralement notre plasma salé en recueillant 15 c. c. de sang dans un tube à saigner contenant déjà 5 c. c. de solution aqueuse de NaCl à 20 0/0. Le sang salé était soumis à une centrifugation prolongée et l'on obtenait un plasma entièrement débarrassé des globules rouges ou blancs et des plaquettes. Si, à une partie de ce plasma décanté, on ajoutait 4 parties d'eau distillée, la coagulation s'opérait au bout d'un temps qui variait suivant les échantillons, mais qui en général était environ d'une demi-heure à trois quarts d'heure.

Ce plasma salé à 5 0/0 se conserve très longtemps sans que ses propriétés se modifient. Gardé pendant une semaine ou deux, il coagule encore par addition d'eau distillée, avec la même facilité qu'au début. Avec une petite provision d'un tel plasma, on peut donc faire un grand nombre d'expériences. Et si, lorsqu'on le dilue d'eau distillée, il ne se prend en masse qu'au bout d'une demi-heure environ (laps de temps qui peut paraître un peu long) cela tient à la dilution des substances actives. En effet, on observe que du sang normal exige un temps assez long pour se coaguler si, au sortir du vaisseau, on le dilue dans 4 ou 5 parties de solution de NaCl à 1 0/0 ; cet effet retardateur de la dilution est d'ailleurs fort naturel[2].

Le plasma salé à 5 0/0, qui se coagule en une demi-heure

1. Cette quantité de sel est notablement supérieure à celle qui suffit à empêcher la coagulation. Pour obtenir un plasma incoagulable, on peut n'ajouter au sang que 2 0/0 de NaCl environ.

2. Dans un travail qui vient d'être publié (*Bulletin de la Société de Biologie*, 20 novembre 1903), M. Stodel observe également l'influence retardatrice de la dilution sur la coagulation du sang.

environ lorsqu'on l'additionne de 4 parties d'eau distillée, donne un caillot dont s'échappe bientôt un sérum riche en fibrin-ferment. En effet, ce sérum, oxalaté à 1 0/00, provoque la coagulation du plasma oxalaté, lequel, nous venons de le rappeler, est un excellent réactif dénotant la présence du fibrin-ferment. — Mais le plasma salé originel, avant d'être dilué par de l'eau distillée, ne renfermait pas de fibrin-ferment ; on peut s'en assurer en faisant intervenir les oxalates alcalins. Tandis que le plasma salé se coagule si on le dilue dans la quantité voulue, 4 parties d'eau distillée, il reste indéfiniment liquide lorsqu'on l'additionne d'une quantité identique d'eau distillée contenant de l'oxalate sodique. Le plasma dilué oxalaté ainsi obtenu, incoagulable spontanément, reprend toute son aptitude à la coagulation lorsqu'on lui restitue ultérieurement un sel calcique soluble en léger excès, de manière à éliminer l'oxalate. — Il en résulte que si le plasma salé à 5 0/0 ne renferme pas de fibrin-ferment, il en renferme la substance mère. La transformation de ce proferment en ferment actif s'opère quand on dilue le plasma salé dans de l'eau distillée pure ; mais elle ne peut s'effectuer si l'on se sert d'eau distillée additionnée au préalable d'oxalate. On obtient ainsi du *plasma dilué oxalaté incoagulable*[1].

Lorsqu'on dilue le plasma salé dans l'eau distillée, au bout de combien de temps le fibrin-ferment commence-t-il à apparaître dans le liquide ?

Une expérience très simple permet de répondre à cette question. Il suffit de diluer du plasma salé dans la quantité voulue d'eau distillée, et de rechercher au bout de combien de temps l'addition d'oxalate empêche encore la coagulation. On mélange 2 c. c. de plasma salé à 8 c. c. d'eau distillée ; immédiatement après, on verse dans divers tubes 9/10 de c. c. du liquide obtenu. L'un des tubes est conservé sans aucune addition ultérieure ; les autres reçoivent, au bout de temps variables (2, 10, 20, 30, 35 minutes), 1/10 de c. c. de solution d'oxalate sodique à 1 0/0. On constate ainsi que le plasma dilué non

1. Ce plasma interviendra fréquemment dans les expériences qui vont suivre. Pour le préparer, nous ajoutons à 1 partie de plasma salé à 5 0/0, 4 parties d'eau distillée, renfermant de l'oxalate neutre de soude en quantité telle que la teneur du mélange en ce sel soit égale à 1 0/00. A vrai dire, une dose notablement plus faible de l'agent décalcifiant peut déjà prévenir la coagulation ; il suffit, pour que celle-ci n'apparaisse point, que le mélange du plasma salé avec l'eau distillée additionnée d'oxalate contienne 0,3 0/00 environ de ce sel.

additionné d'oxalate se coagule au bout de 40 minutes; la coagulation est à peine retardée dans le tube oxalaté 35 minutes après que le plasma dilué a été préparé. Mais les liquides oxalatés au bout de 2, 10, 20, 30 minutes restent indéfiniment liquides. Notons que le plasma oxalaté après 35 minutes présentait, au moment où le sel décalcifiant a été introduit, un léger début de coagulation, affectant la portion de plasma en contact avec la paroi, et dont l'oxalate, intervenant fort tardivement, n'a pu enrayer la propagation à la masse entière du liquide.

Il faut conclure de cette expérience que la production du fibrin-ferment dans le plasma salé, dilué par l'eau distillée, exige un temps assez prolongé, puisqu'on peut, en introduisant de l'oxalate au bout de 30 minutes, empêcher la coagulation d'un plasma qui, abandonné à lui-même, se serait coagulé au bout de 40 minutes. D'autre part, dès que le ferment apparaît, la solidification du plasma s'opère rapidement. Ceci est du reste en parfaite harmonie avec le fait suivant : si, à du plasma dilué qu'on vient de préparer (et qui ne se serait coagulé qu'au bout d'une demi-heure au moins), on ajoute un peu de sérum (1/10 environ) provenant d'une coagulation antérieure d'un plasma de même constitution, la prise en caillot s'effectue en quelques minutes.

Il était nécessaire d'avoir ces données préliminaires présentes à l'esprit, pour pouvoir aborder facilement l'étude de l'influence exercée sur le plasma dilué par le contact de corps solides mouillables, tels que le verre.

***

Commençons par observer comment débute et se propage la coagulation du plasma dilué conservé dans un vase de verre et qu'on a soin de ne pas agiter. Comme nous l'avons dit plus haut, le plasma ne manifeste aucun changement pendant une demi-heure en moyenne. Mais un peu plus tard, on s'aperçoit que le plasma commence à devenir gélatineux au voisinage immédiat de la paroi; c'est même à l'endroit précis où le contact du verre doit influencer le plus activement le liquide, c'est-à-dire au niveau du ménisque concave limitant, contre la paroi, la surface du plasma, que la coagulation apparaît en tout premier lieu; à ce niveau, en effet, où le plasma s'élève en couche mince, un volume de plasma relativement faible adhère à une

étendue de paroi relativement grande. Peu après, l'intérieur du verre se tapisse entièrement de fibrine coagulée. Si, à ce moment, on renverse le vase, la plus grande partie du plasma, restée liquide, s'écoule, et l'on constate que la paroi est doublée d'un véritable sac gélatineux qui s'est moulé sur elle.

C'est donc contre la paroi que la coagulation débute. Le sac de fibrine formé s'épaissit graduellement, avec une certaine lenteur, et la solidification se propage ainsi jusqu'au centre de la masse de plasma.

Mais si la coagulation ne se propage pas très rapidement, de la paroi au centre, lorsque le vase est maintenu immobile, il n'en est plus de même quand le plasma est agité. Si, au moment où la coagulation vient d'apparaître contre la paroi, nous détachons au moyen d'une baguette de verre la portion solidifiée, et nous agitons le liquide, celui-ci se transforme rapidement en un bloc solide. Les choses se passent donc alors comme si nous mélangions du fibrin-ferment au plasma; il semble en d'autres termes que la portion de plasma qui a ressenti le contact du verre est devenue le siège de la production d'une certaine quantité de principe coagulant, qui provoque la prise en caillot totale dès qu'on le mélange intimement à la masse tout entière. Or, il est facile de démontrer qu'il y a là plus qu'une apparence : le contact du verre joue en effet un rôle actif dans la production même du fibrin-ferment.

***

Préparons, dans un verre à pied dont les parois intérieures sont recouvertes d'une couche de paraffine, un certain volume de plasma dilué, en mélangeant une partie de plasma salé avec 4 parties d'eau distillée. Immédiatement après, versons la moitié environ du plasma dans un verre à pied enduit de paraffine, l'autre moitié dans un verre de même forme, mais non paraffiné. On constate dans cet essai, de la manière la plus frappante, la propriété que possède le plasma de se maintenir très longtemps liquide lorsqu'il ne subit d'autre contact que celui de la paraffine. Dans ces conditions, la coagulation toujours très retardée exige souvent plusieurs heures (parfois même 1 ou 2 jours), tandis qu'au contact du verre, elle s'opère en 30 ou 45 minutes.

A vrai dire, certains échantillons de paraffine donnent à ce

point de vue des résultats beaucoup meilleurs que d'autres. Pour que la paraffine agisse bien, il est nécessaire qu'elle ne se laisse aucunement mouiller par le plasma, et que celui-ci puisse rouler sur elle, sans adhérence, comme le mercure sur le verre. On doit remarquer à ce propos que le plasma mouille les objets beaucoup plus facilement que ne le fait l'eau pure; ainsi de nombreuses substances sur lesquelles l'eau glisse sans s'y attacher sont mouillées par le plasma; tels sont certains échantillons de paraffine, et l'on trouve alors que ceux-ci ne conviennent pas pour l'expérience que nous venons de décrire. Il est bon de mélanger par fusion la paraffine solide à une quantité assez forte (2 à 3 volumes) de paraffine ou vaseline liquide. On obtient ainsi une matière assez molle, onctueuse, qui possède à un haut degré les qualités requises.

Au reste, lorsqu'en vase paraffiné le plasma finit par se coaguler, on constate toujours que le processus commence par la paroi. La différence entre le contact du verre et celui de la paraffine n'est donc que relative; en d'autres termes, la paraffine ne possède pas d'une manière tout à fait complète les qualités que nous exigeons d'elle; on pourrait dire que son contact est « perçu par le liquide », mais beaucoup moins que celui du verre.

Le fait qu'un plasma dilué récemment préparé est conservé en vase paraffiné ne contrarie-t-il en rien l'influence du fibrin-ferment? Il est aisé de voir que l'addition de fibrin-ferment (sérum provenant d'une coagulation antérieure) provoque la coagulation très rapide du plasma contenu en vase paraffiné. Au point de vue de l'action du ferment, la paraffine ne joue aucun rôle.

Il faut donc admettre que c'est la production de ce principe coagulant qui fait défaut dans le plasma dilué conservé en paraffine. On peut d'ailleurs le démontrer par une expérience directe, en faisant intervenir, comme réactif du fibrin-ferment, le plasma dilué oxalaté. Ce dernier, on le sait, ne se coagule que par addition de fibrin-ferment, lequel peut du reste être lui-même oxalaté.

Répétons l'expérience précédente, qui consistait à répartir des quantités à peu près égales de plasma dilué (qu'on vient de préparer), dans deux verres à pied, l'un de ceux-ci étant garni intérieu-

rement d'une couche de paraffine. Attendons que, dans le verre non paraffiné, le revêtement de coagulum tapissant la paroi ait nettement apparu. A ce moment, introduisons dans ce plasma, dont la masse centrale est encore liquide, une baguette de verre, et agitons. On défibrine ainsi rapidement le plasma, toute la fibrine venant se coller à la baguette. Pour que tout soit comparable, imprimons, en même temps, les mêmes mouvements au plasma contenu en vase paraffiné (et qui ne présente aucune trace de coagulation), mais en nous servant cette fois d'une baguette de verre enduite de paraffine.

Dès que, dans le verre non paraffiné, la totalité du fibrinogène s'est séparée à l'état de fibrine concrète, prélevons de chacun des deux liquides 9/10 de c. c. que nous transportons dans deux tubes A et B contenant déjà 1/10 de c. c. de solution d'oxalate sodique à 1 0/0. Nos deux liquides (dont l'un, A, est devenu du sérum, dont l'autre, B, est encore du plasma) sont donc oxalatés à 1 0/00. Attendons quelques minutes, puis ajoutons à chacun des deux tubes 1 c. c. de plasma dilué oxalaté à 1 0/00. Le contenu du tube A se solidifie au bout de quelques minutes, celui du tube B reste indéfiniment liquide.

Le contact avec un corps étranger tel que le verre, dont un caractère frappant est d'être mouillable, *favorise donc activement la production du fibrin-ferment aux dépens du proferment.* Cette influence s'observe *en dehors de toute intervention d'éléments figurés.*

L'influence coagulante exercée sur le sang par le contact des corps étrangers, et que les expérimentateurs ont si fréquemment observée, peut donc s'expliquer sans qu'on soit forcé d'invoquer l'irritabilité cellulaire.

La tension superficielle peut, lorsqu'on multiplie les surfaces où elle s'exerce, agir à la façon d'un contact. Diluons du plasma salé avec la quantité voulue d'eau distillée. Dès que le mélange est obtenu, agitons pendant quelques instants ce plasma dilué de façon à y provoquer la formation de bulles qui donnent, à la surface du liquide, une mousse persistante. On constate que dans ces conditions la coagulation est très nettement accélérée et qu'elle débute par les bulles; la mousse devient en quelque sorte solide, se transformant en une gelée spongieuse, et bientôt la coagulation se propage au liquide sous-jacent.

§ II. Role des sels de chaux dans la production du fibrin-ferment.

On admet généralement (à vrai dire, cette opinion n'est pas encore unanimement acceptée) que le pouvoir anticoagulant des oxalates est dû à ce que ceux-ci précipitent les sels calciques indispensables à la transformation du proferment en fibrin-ferment actif (Pekelharing). Ce qui interviendrait, ce ne serait donc pas une influence antagoniste appartenant en propre aux oxalates, ce serait simplement l'élimination de la chaux. Cette interprétation compte déjà, à son actif, des expériences démonstratives[1], et cela nous dispensera de nous étendre longuement sur ce sujet.

Nous nous bornerons à signaler une expérience très simple, dans laquelle on ne fait intervenir aucune autre substance que le plasma, l'oxalate et l'eau, et qui, nous semble-t-il, corrobore d'une manière très positive l'idée de la nécessité des sels calciques pour la production du fibrin-ferment. Elle est fondée sur ce fait que la réaction entre les sels de chaux et l'oxalate s'effectue rapidement dans les liqueurs concentrées, s'opère au contraire lentement et incomplètement lorsque celles-ci sont fortement diluées.

Pour pouvoir se coaguler, notre plasma salé à 5 0/0 exige l'addition d'eau distillée. Mais si nous désirons lui faire perdre son aptitude à la coagulation en y ajoutant environ 1 0/00 d'oxalate sodique[2], la dose voulue de ce sel peut être introduite soit avant, soit après la dilution par l'eau distillée. Or, on obtient des résultats très différents suivant le moment auquel on fait intervenir l'agent décalcifiant.

A 5 c. c. de plasma salé, ajoutons 1 c. c. de solution physiologique contenant 0, 75 0/0 de NaCl et dans laquelle on a fait dissoudre 0, 5 0/0 d'oxalate sodique. Il se produit rapidement un trouble intense d'oxalate calcique. Introduisons alors dans le mélange 20 c. c. d'eau distillée; malgré cette dilution, le trouble dû à l'oxalate calcique se perçoit encore très visiblement.

1. Par exemple, si l'on prépare du sang oxalaté a 1 0/00, et qu'on y ajoute ensuite 2 0/00 de chlorure de magnésium, on constate que le liquide se coagule par addition de traces de sels calciques, insuffisantes à précipiter l'exès d'oxalate; cela tient à ce que, en présence de chlorure de magnésium, des traces de sels de chaux ne précipitent point l'oxalate. Cette expérience est due à Arthus.

2. Environ 1 0/00 par rapport au volume du plasma salé, et non pas relativement au volume total (plasma salé + eau distillée).

D'autre part, à 5 c. c. de plasma salé, ajoutons d'abord 20 c. c. d'eau distillée; puis, immédiatement après, 1 c. c. de la solution d'oxalate. Le liquide reste limpide ; il faut en conclure que grâce à la dilution, la précipitation de la chaux par l'oxalate ne peut s'opérer.

Or, le premier mélange ne se coagule jamais. Dans le second, la coagulation s'effectue au bout d'un temps un peu plus long que si l'on n'avait pas ajouté d'oxalate, mais le retard n'est pas considérable. Et pourtant, des deux liquides, c'est celui où la coagulation s'opère qui contient le plus d'oxalate, puisque dans ce liquide il ne s'est point fait de précipitation de l'oxalate par la chaux. L'oxalate ne gêne donc point la coagulation si l'on s'arrange pour qu'il n'insolubilise pas les sels calciques. Il est presque superflu d'ajouter que le premier mélange, qui conserve tel quel, se maintient liquide, se coagule par addition d'une trace de chlorure calcique. D'autre part, on peut naturellement précipiter par l'oxalate la chaux du plasma, même après avoir dilué ce dernier dans l'eau distillée, et obtenir ainsi le plasma dilué oxalaté incoagulable employé dans certaines expériences citées plus haut[1]. Mais il faut alors introduire une dose d'oxalate plus élevée, capable de précipiter les sels calciques au bout d'un temps assez court.

1. Rappelons que ce plasma contenait de l'oxalate à dose de 1 0/00 par rapport au volume total (plasma salé + eau distillée).

Le passage du Virus rabique à travers les filtres.

PAR LE Dr REMLINGER

Directeur de l'Institut impérial de bactériologie, à Constantinople.

Il est classique de dire que le virus rabique est retenu par les filtres et d'en conclure que l'agent pathogène de la rage doit être un agent figuré. L'accord cesse lorsqu'il s'agit d'établir quel est cet agent : bacilles de Bruschettini, Saccharomyces de Lévy, protozoaires de Negri, de Guarnieri, etc. pour ne citer que les plus récents. En effet, Nocard en 1880, Paul Bert en 1882 font passer à travers du plâtre de la salive d'animaux enragés et constatent l'innocuité du filtrat. En 1889, de Blasi et Russo-Travali filtrent à travers la bougie Chamberland des émulsions de cerveau de lapin ayant succombé au virus fixe. En les inoculant ensuite à des chiens à doses élevées, ils voient ces animaux succomber au milieu de phénomènes cachectiques et paralytiques rappelant beaucoup la rage, mais le bulbe inoculé se montre inactif, et les auteurs expliquent par l'existence d'une toxine rabique les phénomènes observés. C'est également à cette conclusion que se range Babès à la suite d'expériences analogues entreprises avec les bougies Chamberland, Kitasato et d'Arsonval. Tout récemment, Guarnieri constate l'innocuité des filtrats Chamberland et Kitasato, et tire de là un argument en faveur de la nature pathogène de son sporozoaire. L'opinion, on le voit, est unanime : *Le virus rabique ne traverse pas les filtres.* Le but du présent travail est précisément de démontrer l'inexactitude de cette proposition, et d'établir qu'au rebours de l'opinion classique le virus rabique *traverse les filtres*... ou du moins certains filtres. Nous examinerons ensuite quelles conclusions on peut tirer de ce fait au point de vue de la nature de l'agent pathogène de la rage.

I

L'INOCULATION SOUS-DURE-MÉRIENNE DU VIRUS RABIQUE FILTRÉ DONNE LA RAGE AU LAPIN.

Le virus rabique, filtré à travers les bougies Chamberland B ou F, s'est toujours montré inactif, ainsi que le fait avait été bien vu avant nous. Nous n'avons même jamais observé avec

cette bougie les phénomènes cachectiques et paralytiques signalés par de Blasi et Russo-Tavali. Il est vrai que nous inoculions de petites quantités de virus sous la dure-mère du lapin et non, comme ces auteurs, des doses massives sous la peau du chien. Cette dernière façon de procéder est évidemment plus favorable à l'observation des phénomènes d'origine toxinique... Nous nous sommes donc servi exclusivement de bougies Berkefeld, filtres siliceux en terre d'infusoires, comme chacun sait. Ces bougies constituent 3 cribles différents. Suivant qu'elles sont très perméables à l'eau, moyennement ou peu perméables, on les désigne par les lettres V (abréviation pour *Viel*, « qui donne beaucoup d'eau ») N (normal) et W (abréviation pour *Wenig*, « qui donne peu d'eau »). Pour chacune de ces trois perméabilités, il existe des dimensions différentes, numérotées de 1 à 16, Nous avons fait exclusivement usage de bougies cylindriques mesurant 5 centimètres de long sur 2 centimètres 1/2 de large, Les bougies N et W se comportent vis-à-vis du virus rabique comme les bougies Chamberland. Elles ne se laissent pas traverser. A moins d'indication spéciale, c'est toujours de la bougie V qu'il s'agira dans ce qui va suivre. Stérilisée à l'autoclave par un séjour de 20 minutes à 115°, puis mise en rapport avec la trompe, cette bougie, tout au moins dans la majorité des cas, ne laisse passer aucun microbe. Mais il faut pour cela :

1° Que la filtration soit rapide, extemporanée en quelque sorte;

2° Que la bougie soit neuve.

En cas de filtration prolongée, la bougie V devient un filtre imparfait. De même une bougie qui, ayant servi une première fois, a dû ensuite être régénérée, court le risque de laisser passer des germes. D'où l'obligation d'employer à chaque nouvelle expérience une bougie neuve.

Comme test, nous avons fait usage de l'eau de conduite du laboratoire. Cette même eau, riche en microbes variés et particulièrement en vibrions très fins et très mobiles, avait déjà servi à M. M. Nicolle au cours de ses remarquables recherches sur la filtration du virus pestique. Elle a été signalée par lui comme un indicateur excellent. Après chaque expérience, le filtrat était ensemencé, à des doses variant de quelques gouttes à plusieurs centimètres cubes, dans 12 tubes de bouillon, dont 6 étaient

mis à l'étuve à 37° et 6 autres laissés à la température de la chambre. Il va de soi qu'il sera tenu compte exclusivement des expériences où, 15 jours après l'ensemencement, aucun de ces 12 tubes ne s'était troublé. Par surcroît de précautions, comme nous opérions sur le lapin, éminemment réceptif au très petit microorganisme qu'est la pasteurellose aviaire, l'émulsion à filtrer était additionnée chaque fois de quatre à cinq cultures en bouillon de choléra des poules virulent...

Toutes les expériences ont été faites avec le virus fixe, avec le cerveau des lapins dont la moelle était utilisée d'autre part pour le traitement antirabique... Systématiquement au début des recherches, par la suite chaque fois que se présentait la moindre anomalie, le diagnostic de rage était assuré par des passages sous-dure-mériens. C'est dans ces conditions, à l'abri, semble-t-il, des causes d'erreur qu'ont été obtenus les résultats suivants :

Expérience I[1]. — Le 16 avril 1903, le cerveau d'un lapin ayant succombé au virus fixe est trituré à l'aide d'une baguette de verre, et converti en une pulpe fine à laquelle on incorpore peu à peu 200 grammes d'eau de conduite. On ajoute 4 tubes de bouillon d'une culture virulente de choléra des poules, et on filtre par aspiration à travers Berkefeld V. Le filtrat est ensemencé dans 12 tubes de bouillon et, d'autre part, inoculé à la dose de 1/8 à 1/4 de centimètre cube sous la dure mère de 11 lapins.

2 lapins meurent accidentellement : le premier le 20, le deuxième le 22 avril. Les préparations et ensemencements pratiqués avec le sang du cœur, les pulpes hépatique et splénique ne dénotent la présence d'aucun microorganisme. En particulier, aucune pasteurellose.

Le 26 avril (10e jour) un 3e lapin présente un commencement de paralysie des membres antérieurs. Le 27, rage paralytique classique. Mort dans la nuit du 27 au 28. On fait un passage avec le bulbe. Le lapin pris le 10e jour succombe le 12e, et la rage est ensuite transmise régulièrement de lapin à lapin à l'aide de ce virus. Le 1er mai (15e jour), un 4e lapin présente des phénomènes paralytiques ne différant en rien de ceux de la rage ordinaire. Il meurt le surlendemain. Le bulbe sert à faire un passage chez 2 lapins. Ceux-ci sont pris le 12 mai (9e jour) et succombent le 14. Un nouveau passage fournit un résultat identique.

7 lapins sont demeurés indemnes.

Les ensemencements sont restés stériles aussi bien à 37° qu'à 22°.

Expérience II. — Le 12 mai 1903, le cerveau d'un lapin ayant succombé

1. Cette expérience et les deux suivantes ont fait l'objet de communications à la Société de biologie aux séances du 13 juin et du 11 juillet 1903. Les filtrations ont été faites avec l'aide du Dr Riffat-Bey, que nous remercions de son utile concours.

au virus fixe est pilé dans un mortier et converti en une pulpe extrêmement fine. On lui incorpore très lentement 200 grammes d'eau de conduite, et on obtient de la sorte une émulsion plus ténue et plus homogène que dans l'expérience précédente. On ajoute 4 tubes de bouillon d'une culture virulente de choléra des poules, et on filtre à travers Berkefeld V. Le filtrat est inoculé après trépanation sous la dure-mère de 10 lapins, mais cette fois à la dose de 1/4 à 1/2 c. c.

Aucun lapin ne succombe accidentellement ou du fait du choléra des poules.

Un 1er lapin présente le 29 mai (11e jour) une paralysie classique, et meurt le 31. Passage chez 2 lapins. Ceux-ci pris le 8 juin (8e jour) succombent le 10.

Un 2e et un 3e lapin, pris le 30 mai (12e jour), meurent le 1er juin. Ici encore les passages viennent confirmer le diagnostic de rage.

Enfin, un 4e lapin pris le 30 mai comme les 2 précédents, meurt comme eux le 1er juin. Les symptômes étant identiques, on juge inutile de faire un passage.

6 lapins sont demeurés indemnes. Les ensemencements du filtrat à 37° ou à 22° sont demeurés stériles.

Expérience III. — Le 11 juin, le cerveau d'un lapin ayant succombé au virus fixe est pilé au mortier et converti en une pulpe très fine. Cette pulpe est incorporée peu à peu à 300 grammes d'eau de conduite. On ajoute 4 tubes de bouillon d'une culture virulente de choléra des poules. Le tout est filtré au travers d'une bougie Berkefeld V, neuve et stérilisée à l'autoclave. La filtration est opérée rapidement par aspiration à la trompe, et le filtrat (stérile d'après les ensemencements) est inoculé à la dose de 1/2 à 1 c. c. sous la dure-mère de 8 lapins.

Le 20 juin, 1 de ces lapins présente de l'anorexie et de la tristesse. Le 21, commencement de paralysie des membres postérieurs. Le 22, la rage paralytique est classique. Mort le 23 (12e jour). Le bulbe est inoculé sous la dure-mère de 3 lapins. Tous succombent à la rage dans les délais habituels.

Le 22 juin, début de la paralysie chez un 2e lapin. Mort le 24 (13e jour). Il est fait 2 passages. L'un et l'autre confirment le diagnostic de rage.

Le 21 juin (10e jour), un 3e lapin montre de la tristesse, de la somnolence, de l'anorexie, et on croit qu'il va prendre la rage. De fait, le lendemain, il présente un commencement de paralysie des membres antérieurs. Il est trouvé mort le 23 au matin. L'autopsie est immédiatement pratiquée. Néanmoins, les organes et en particulier le système nerveux sont déjà dans un état de décomposition avancée. Les lapins inoculés par voie sous dure mérienne succombent prématurément à une infection des méninges par le staphylocoque et le coli-bacille. 2 lapins inoculés sous la peau avec 5 c. c. d'émulsion chacun n'ont présenté aucune modification pathologique. Nous nous expliquerons dans un instant sur l'interprétation dont paraissent justiciables ces phénomènes.

La relation d'expériences plus nombreuses serait sans intérêt. Toutes se trouvent en quelque sorte calquées sur les précédentes.

Dans les 3 faits relatés, sur 29 lapins inoculés, 3 ne doivent pas entrer en ligne de compte, 8 ont pris la rage (30,76 0/0), 18 sont demeurés indemnes (69,23 0/0). Cette proportion de 30 0/0 se retrouve à peu près identique dans la majorité des expériences. Mais de même que nous avons insisté sur les précautions qu'il convient de prendre pour ne retenir que les faits bien légitimes de passage du virus à travers la bougie (bougie neuve — filtration extemporanée — usage comme test d'eau de conduite et de culture de choléra des poules), de même nous devons indiquer les conditions qu'il est nécessaire de remplir si on veut observer ce passage même :

1° Il faut opérer sur un cerveau de lapin entier qu'on triturera dans un mortier à l'aide d'un pilon, de façon à convertir la substance nerveuse en une pulpe extrêmement fine. A cette pulpe on incorporera très lentement, goutte à goutte pour ainsi dire, de 300 à 400 grammes d'eau de conduite. Cette façon de procéder est indispensable pour l'obtention d'une émulsion homogène, bien exempte de grumeaux.

2° Le filtrat doit être inoculé sous la dure-mère du lapin à raison non pas de quelques gouttes, mais de 1/2 à 1 c. c. par tête d'animal. L'injection étant poussée lentement, progressivement, il ne s'ensuit de troubles d'aucune sorte.

3° Il est nécessaire d'opérer chaque fois sur un nombre assez élevé de lapins, une dizaine, par exemple[1].

La proportion des animaux qui prennent la rage dans ces conditions se rapproche le plus souvent de 30 0/0. Mais il faut noter qu'il existe parfois, d'une bougie V à une autre, des variations de porosité assez considérables, et qu'en rapport avec ces variations, on peut observer un chiffre d'atteintes, beaucoup moindres comme aussi bien plus élevé. Les expériences suivantes en font foi :

Expérience I. — Le 5 septembre, un cerveau de lapin est converti en une pulpe fine, et incorporé à 300 grammes d'eau de conduite. L'émulsion filtrée à travers Berkfeeld V est inoculée à la dose de 1/2 à 1 c. c. sous la dure-mère de 10 lapins. Le 17 septembre (12e jour), l'un de ces animaux com-

1. Tous nos lapins étaient du poids de 1,500 grammes ou à peu près. Pour aller vite, lorsqu'on doit inoculer un grand nombre d'animaux, on peut se servir de jeunes lapins, chez lesquels la fontanelle antérieure n'est pas encore ossifiée. L'aiguille de la seringue pénètre directement sous la dure-mère, sans le secours de trépan, de foret d'aucune sorte, et les inoculations se font avec une grande rapidité.

mence à présenter les symptômes de la rage paralytique. Il meurt le 18. 9 lapins sont demeurés indemnes. Proportion des atteintes : 10/100.

Expérience II. — Le 22 août, un cerveau de lapin est converti en une pulpe fine à laquelle on incorpore 300 grammes d'eau de conduite. On filtre à travers Berkefeld V et on inocule le filtrat à la dose de 1/2 à 1 c. c. sous la dure-mère de 10 lapins. 12 tubes de bouillon copieusement ensemencés demeurent stériles, les uns à la température de l'étuve, les autres à celle du laboratoire. 2 lapins contractent la rage le 2 septembre et meurent le 4. 3 autres pris le 3 meurent le 5. 5 lapins (exactement la moitié) sont restés indemnes. Proportion des atteintes : 50/100.

Expérience III. — Le 3 août, à l'occasion d'une expérience de centrifugation dont il est parlé plus loin, 30 lapins reçoivent sous la dure-mère de 1/2 à 1 c. c. de virus rabique filtré. Ensemencements demeurés stériles à 37° et à 22°. Du 14 au 17 août, 23 lapins ont succombé à la rage. 2 seulement sont demeurés indemnes. Des passages ont été faits avec le bulbe de 2 animaux pris les premiers (au 10e jour, mort au 12e) et des 2 pris les derniers (au 12e jour, mort au 14e). Rage classique dans l'un et dans l'autre cas. Proportion des atteintes : 93 0/0.

Sans qu'aucune faute de technique doive être incriminée, on peut donc, avec Berkefeld V, voir succomber la moitié et plus des animaux inoculés.

De ce fait, il faut rapprocher le suivant, que la bougie V ne donne pas exactement la limite de perméabilité des filtres Berkefield au virus rabique. La maison Berkefield a bien voulu nous livrer des bougies à perméabilité intermédiaire à V et à N. Nous les désignerons par les lettres V′ et V″. Or, nous avons constaté que le virus était arrêté par V″, mais traversait V′.

Le 9 juillet, un cerveau de lapin est incorporé à 300 c. c. d'eau distillée. On filtre à travers Berkefeld V′ et on inocule à la dose de 1/2 à 1 c. c. sous la dure-mère de 10 lapins. Résultat des ensemencements : négatif. Le 20 juillet (11e jour), 2 lapins présentent les premières manifestations de la rage et succombent le surlendemain. Leur bulbe sert à faire des passages dans le cerveau d'autres lapins. Résultat positif. 8 animaux sont demeurés indemnes.

La même expérience est répétée dans des conditions identiques avec V″. Aucun des 10 lapins inoculés n'a contracté la maladie.

Nous nous sommes demandé si, en diluant un cerveau entier dans 300 c. c. d'eau, nous ne filtrions pas à travers la bougie une émulsion trop épaisse, susceptible de colmater les

parois et de s'opposer, au bout de peu de temps, au passage du virus. On sait que le degré de la dilution a une influence marquée sur le passage à travers les filtres des virus de la péri-pneumonie, de la Horse-Sickness..., etc.

Nous n'avons rien observé d'analogue avec le virus rabique. Avec la bougie V, la proportion des animaux atteints n'a pas varié sensiblement suivant l'étendue de la dilution, et, de même, nous ne sommes jamais parvenu, en diluant l'émulsion, à faire traverser au virus rabique les bougies Berkefeld N ou Chamberland F. Il est probable qu'un moyen efficace de triompher de la résistance de la bougie N à se laisser traverser par le virus rabique eût été d'user ses parois de façon à en diminuer l'épaisseur. Toutefois, nous n'avons pas répété cette expérience réalisée, comme on sait, par M. Nicolle avec le virus pestique. De même, le virus claveleux ne passe jamais à la bougie Chamberland F. Il passe, par contre, presque toujours aux bougies F^4, F^5... F^{10} débitant 4, 5... 10 fois plus que les bougies F (Borrel). Le virus rabique se comporte très probablement de façon analogue. Mais nous n'avons pas été à même de le vérifier.

Une particularité constante dans la transmission de la rage à l'aide de virus filtré, c'est le prolongement de la période d'incubation. Chez les lapins de passage, c'est toujours du 8e au 10e jour que les premiers symptômes de la maladie font leur apparition. La mort survient du 9e au 12e. Chez les lapins inoculés avec le virus filtré, on n'observe jamais de période d'incubation inférieure à 10 jours. La grande majorité des animaux est prise le 11e, quelques-uns le 12e jour. Nous avons observé une incubation de 13 jours et une autre de 14. La mort survient en général du 12e au 14e jour. On le voit, la durée de la maladie est la même, qu'il s'agisse de virus fixe ou de virus filtré. La durée de l'incubation diffère seule. Cette prolongation est évidemment en rapport avec le petit nombre de germes inoculés sous la dure-mère avec le filtrat. Dès le 1er passage, l'incubation revient à la normale : 8 à 10 jours. Il est intéressant de faire remarquer que le même allongement de l'incubation s'observe chez les individus inoculés avec du sérum filtré d'amarillique. Cette incubation fut de 10 jours dans une expérience de Parker, Beyer et Pothier, et, très probablement, de 8 (au lieu de 2 à 5) dans un cas de Reed et Caroll[1].

1. Voyez *Bulletin de l'Institut Pasteur*, 1903, n° 15, page 588.

Il nous reste à dire un mot des faits suivants. Nous les avons observés 5 fois seulement sur un total de plus de 200 inoculations sous-dure-mériennes de virus filtré, mais ils se sont toujours présentés si parfaitement identiques à eux-mêmes que la possibilité d'un hasard ou d'une coïncidence s'en trouve exclue. Le lapin qui a reçu sous la dure-mère du virus filtré à travers Berkefeld V ne présente, pendant 10 jours, aucune modification pathologique. Le 10e ou le 11e jour, il montre de la tristesse, de la somnolence, de l'anorexie, et on croit qu'il va prendre la rage. De fait, le lendemain, un commencement de paralysie des membres antérieurs ou postérieurs vient confirmer ce diagnostic. Cependant, alors que la durée moyenne de la rage expérimentale est de 2 jours, quelques heures après l'apparition de cette paralysie, l'animal se couche sur le côté et il ne tarde pas à succomber. L'autopsie, immédiatement pratiquée, révèle déjà un commencement de ramollissement du système nerveux, et les ensemencements pratiqués avec le cerveau, le sang du cœur, la pulpe splénique et hépatique dénotent un envahissement hâtif par des microbes d'infection agonique, le staphylocoque et le coli-bacille en particulier. Les lapins inoculés sous la dure-mère avec une émulsion du bulbe, succombent le lendemain ou le surlendemain au milieu de phénomènes méningitiques. Ceux qui ont été inoculés sous la peau avec des doses considérables : 5 à 10 c. c. d'émulsion nerveuse, ne présentent de réaction locale ni générale d'aucune sorte, et demeurent tout à fait indemnes.

Dans l'appréciation de ces faits, il paraît juste de tenir compte des particularités suivantes :

a) Ils se produisent constamment après une période d'incubation identique à celle de la rage;

b) Leur physionomie clinique rappelle beaucoup cette affection;

c) Dans la même série d'expériences, d'autres animaux présentent une rage véritable, ainsi que les passages en font foi.

Sans doute, chez le lapin, la rage expérimentale ne déroule pas nécessairement son cortège classique. La mort peut se produire après une courte période de paralysie; elle peut même survenir subitement. Néanmoins, devant la constance des résultats expérimentaux négatifs, il paraît impossible d'attribuer à la rage même les symptômes qui viennent d'être décrits. Il semble

plus logique de les attribuer à la toxine rabique qui, exceptionnellement, pourrait traverser Berkefeld V, indépendamment du virus, et qui jouirait de la propriété de favoriser l'envahissement de l'organisme par les microbes agoniques. Contre cette hypothèse, nous devons cependant ajouter que nous n'avons jamais observé de phénomènes analogues, soit chez les lapins inoculés sous la dure-mère avec des filtrats Berkefeld N, W ou Chamberland F, soit chez les animaux ayant reçu sous la peau des doses massives de filtrat V, N ou W au cours des expériences qu'il nous reste à relater.

II

L'INOCULATION SOUS-CUTANÉE DE VIRUS FILTRÉ IMMUNISE LE LAPIN CONTRE LA RAGE

Le lapin est beaucoup moins réceptif à la rage par la voie sous-cutanée que par la voie sous dure-mérienne. Si on lui injecte sous la peau une petite quantité de virus, il ne contracte pas la maladie, et il acquiert de ce fait un certain degré de résistance qui pourra devenir une immunité complète, si les inoculations sont répétées à doses croissantes, convenablement choisies et espacées. De même, si, à doses croissantes, on injecte sous la peau d'un lapin du virus filtré à travers Berkefeld V, l'animal ne prend qu'exceptionnellement la rage. Nous avons observé le fait une seule fois. Encore était-ce au début de nos expériences, alors que nous n'avions pas acquis dans le maniement des doses une habileté suffisante. Au fur et à mesure que les quantités inoculées augmentent, l'animal acquiert vis-à-vis du virus rabique une plus grande résistance. Lorsque la dose totale injectée sous la peau approche de 500 c. c., il est complètement immunisé[1], et supporte sans la moindre réaction l'épreuve sévère de l'inoculation sous-dure-mérienne avec le virus fixe.

Expérience. Un 1er lapin reçoit sous la peau, du 21 mars au 16 avril 1903, 63 c. c. de virus filtré à travers Berkefeld V. Le 18 avril il est trépané et inoculé sous la dure-mère avec le virus fixe. Les premiers symptômes de la rage font leur apparition le 26 (au 8e jour) et la mort survient le 29 (11e jour). Un lapin témoin est pris et meurt dans les mêmes conditions.

1. Poids de tous les lapins dont il est question dans ce paragraphe : 1,500 grammes.

Un 2e lapin a reçu sous la peau, du 9 avril au 4 mai, 140 c. c. de virus filtré. Le 7 mai, inoculation sous-dure-mérienne. Le 16 mai au soir (9e jour) on note un commencement de paralysie du train postérieur. Le lendemain, l'état de l'animal est stationnaire; la paralysie ne semble pas avoir progressé. Le 18 mai, la paralysie s'accuse davantage. Amaigrissement considérable. Le 19, le lapin est couché sur le côté. Mort le 20, au 13e jour, après 5 jours de maladie — Deux témoins ont été pris l'un le 15, l'autre le 16 mai, et sont morts le 1er le 17, le 2e le 18 (10e et 11e jour).

Un 3e lapin a reçu dans les mêmes conditions du 9 avril au 10 mai, 200 c. c. de virus filtré. Il est trépané le 14. Le 26 mai (12 jours après l'inoculation), l'animal est très bien portant et on se demande s'il ne résistera pas (un témoin pris le 23 était mort le 25) lorsque le 27, on s'aperçoit d'un début d'amaurose. L'animal continue à s'alimenter. Le 28 (14e jour) il est tout à fait aveugle et on note un commencement de paralysie des membres postérieurs. Le 29, la rage paralytique parait manifeste. Mort le 30 (16e jour). A l'autopsie, émaciation considérable, mais aucune lésion d'organe. Un lapin inoculé sous la dure-mère avec une émulsion du bulbe ne prend pas la rage. Un mois plus tard, ce même animal était trépané à nouveau avec du virus fixe et succombait cette fois dans les délais ordinaires. Il était donc réceptif[1].

Un 4e lapin reçoit sous la peau, du 21 mars au 6 juin 1903, 500 c. c. de virus rabique filtré à travers Berkefeld V. La progression a été la suivante:

12 mars, 10 c. c.; 28 mars, 10 c. c,; 9 avril, 15 c. c.; 16 avril, 20 c. c.; 20 avril, 20 c. c.; 30 avril, 40 c. c.; 4 mai, 40 c. c.; 10 mai, 60 c. c.; 16 mai, 65 c. c.; 21 mai, 70 c. c.; 30 mai, 70 c. c.; 6 juin, 80 c. c. Total : 500 c. c.

Le 12 juin, il est trépané avec du virus fixe. Alors que deux témoins succombent dans les délais classiques, il ne présente aucun symptôme pathologique. Une 2e trépanation est également demeurée sans résultat.

Il est donc possible — à l'aide d'injections sous-cutanées de virus filtré à travers Berkefeld V — d'immuniser complètement le lapin vis-à-vis de l'injection intra-cérébrale de virus fixe. Ce fait constituera une nouvelle preuve de la traversée de la bougie V par le virus rabique, s'il est démontré que cette immunité n'est due ni à des cadavres microbiens, ni à une toxine. Or, cette démonstration résulte des deux constatations suivantes :

1° L'injection sous-cutanée de virus filtré à travers Berkefeld W ne confère aux lapins aucune immunité;

1. Nous avons eu l'occasion d'observer récemment un lapin complètement réfractaire à la rage. Cet animal — acheté quelques jours auparavant au marché de Stamboul — est trépané le 22 février pour les besoins de l'Institut antirabique, et ne présente consécutivement aucun symptôme morbide. Il est préparé à nouveau le 14 avril. Même absence de réaction. 3e trépanation (cette fois extrêmement sévère) le 9 mai. Toujours pas de réaction.

2° La stérilisation par l'éther fait perdre au virus filtré à travers V ses propriétés immunisantes.

1° *L'injection sous-cutanée de virus filtré à travers Berkefeld W ne confère aux lapins aucune immunité.*

Expérience I. — Du 2 juillet au 14 septembre, 2 lapins reçoivent sous la peau chacun 500 c. c. de virus rabique filtré à travers la bougie Berkefeld W. Le 17 septembre, ces animaux sont trépanés à l'aide de virus fixe. L'un d'eux est pris le 26 septembre et meurt le 27 (10e jour). Le second, pris le 27, meurt le 28 (11e jour).

Le 17 septembre également, on trépane avec le même virus et dans des conditions identiques un lapin qui, du 27 juin au 15 septembre, avait reçu sous la peau 500 c. c. de virus rabique filtré à travers Berkefeld V. Cet animal n'a présenté aucun symptôme pathologique.

Expérience II. — Du 2 juillet au 24 septembre, un lapin reçoit sous la peau 700 c. c. de virus rabique filtré à travers Berkefeld W.

Du 27 juin au 24 septembre, un second lapin reçoit sous la peau 500 c. c. de virus filtré à travers Berkefeld V. Ces animaux sont trépanés à l'aide du virus fixe le 26 septembre. Le premier présente à la date du 5 octobre (9e jour) les symptômes caractéristiques de la rage paralytique et succombe le surlendemain. Le second (500 c. c. de virus V) n'a montré du 8e au 12e jour après l'inoculation aucun phénomène pathologique. Il est encore actuellement vivant et bien portant.

2° *La stérilisation par l'éther fait perdre au virus filtré à travers la bougie V ses propriétés immunisantes.*

Expérience I. — Un cerveau de lapin ayant succombé au virus fixe est converti dans un mortier en une pulpe très fine et incorporé à 300 c. c. d'eau de conduite. L'émulsion obtenue est filtrée à travers Berkefeld V. Le filtrat, versé dans un flacon stérile, est additionné d'un égale quantité d'éther sulfurique, et on laisse 24 heures en présence en ayant soin d'agiter de temps en temps. Au bout de 24 heures, l'éther est évaporé au moyen d'une cloche à vide, et le filtrat injecté à doses progressivement croissantes sous la peau de deux lapins. Du 11 août au 24 septembre, ces 2 animaux reçoivent de la sorte 500 c. c. de virus filtré à travers V, puis traité par l'éther. La progression a été la suivante :

11 août, 15 c. c.; 19 août, 40 c. c.; 27 août, 40 c. c.; 3 septembre, 80 c. c.; 7 septembre, 100 c. c.; 17 septembre, 120 c. c.; 24 septembre, 105 c. c. Total : 500.

Le 26 septembre, trépanation avec le virus fixe. Un 3e lapin ayant reçu dans le même espace de temps 500 c. c. de virus filtré à travers V, mais non stérilisé, sert de témoin. Cet animal n'a présenté aucun symptôme de rage. Les deux autres ont été pris le 4 octobre (8e jour) et sont morts le 6.

Il résulte de ces expériences une nouvelle preuve du passage du virus à travers la bougie V. Le virus filtré immunise le

lapin contre la rage. Or, cette immunisation n'est le fait ni de cadavres microbiens ni de toxine, puisqu'elle ne se produit ni avec le filtrat W, ni avec le virus stérilisé par l'éther. Il reste qu'elle soit causée par le virus rabique lui-même. Donc ce virus traverse V. C'est la corroboration des faits produits dans la première partie de ce travail.

III

L'AGENT PATHOGÈNE DE LA RAGE EST UN ORGANISME ULTRA-MICROSCOPIQUE

Des faits que nous venons de relater, quelles déductions peut-on tirer au point de vue de la nature du virus rabique? S'il est démontré que ce virus traverse la bougie Berkefeld dans des conditions où elle retient les autres microorganismes, il s'ensuit que l'agent pathogène de la rage ne saurait être un microbe qui, de dimensions analogues à celles des microbes pathogènes ordinaires, se déroberait à l'investigation... grâce à des réactions spéciales vis-à-vis des matières colorantes, par exemple. Il semble dès lors que les seules hypothèses à discuter se réduisent à trois :

a) L'agent pathogène de la rage est un sporozoaire visible;

b) Le virus rabique est un *contagium vivum fluidum* (Beijerinck);

c) La rage est causée par un organisme ultra-microscopique.

a) *A priori*, l'hypothèse d'un sporozoaire visible paraît peu compatible avec la constatation du passage d'un virus à travers une bougie filtrante. Cependant M. Bosc [1] a émis l'opinion que les parasites de la clavelée « dont les formes de division visibles peuvent ne mesurer que 1/2 μ [2], doivent à leur structure plasmodiale de pouvoir s'étirer à travers les pores des bougies comme à la filière » et par conséquent de passer à travers les filtres. Il ne semble pas que, tout au moins pour la rage, cette hypothèse soit admissible. En effet, si le virus rabique

1. Bosc, *Épithélioma claveleux du poumon*. Société de Biologie, séance du 2 mai 1903, page 537.

2. On sait qu'avec les meilleurs instruments, nous ne pouvons distinguer un corpuscule de moins de 0μ,1.

filtré doit ses propriétés à un parasite de 0 μ,5 de diamètre, ce parasite centrifugera facilement, et les inoculations comparées avec le culot et le filtrat superficiel donneront des résultats très différents. Or il n'en est rien, comme le montrent les expériences suivantes.

Expérience I. — Le 13 juillet, un cerveau de lapin est réduit en pulpe et incorporé à 400 c. c. d'eau de conduite. On filtre à travers Berkefeld V et une partie de ce filtrat est centrifugée pendant 1 heure à l'aide de l'appareil de Kraüs. 7 lapins reçoivent sous la dure-mère du virus non centrifugé, 7 autres reçoivent la partie supérieure du filtrat contenu dans les godets et 7 autres la partie inférieure, la partie moyenne du liquide ayant été rejetée. Les lapins du 2e groupe sont tous demeurés indemnes. Dans chacune des 2 autres séries, 1 animal a contracté la rage. Il est à noter que les 2 lapins inoculés avec les dernières gouttes des godets à centrifugation ont échappé à la maladie.

Expérience II. — Le 3 août, un cerveau de lapin est incorporé de même à 300 c. c. d'eau distillée et l'émulsion est filtrée à travers Berkefeld V. Une partie du filtrat est centrifugée pendant 1 heure 1/4 à l'appareil de Kraüs, puis 30 lapins sont inoculés sous la dure-mère, 10 avec du virus non centrifugé, 10 avec le virus centrifugé superficiel, 10 avec le virus centrifugé profond. Tous ces animaux — à l'exception de 2 appartenant au 2e groupe — ont succombé à la rage. Les ensemencements pratiqués avec le virus filtré sont demeurés stériles aussi bien à 37° qu'à 22°. La proportion extrêmement élevée des animaux qui ont succombé au cours de cette expérience doit être attribuée vraisemblablement à une perméabilité fortuitement plus considérable de la bougie.

Expérience III. — Même expérience le 5 septembre. Centrifugation pendant 1 heure 1/4 à l'aide de l'appareil de Kraüs. Trépanation de 24 lapins. Des 8 inoculés avec le virus non centrifugé, 1 a pris la rage. Dans le groupe des animaux ayant reçu le virus centrifugé profond, 2 animaux ont contracté la maladie. Des 2 lapins trépanés avec les dernières gouttes restant dans les godets de centrifugation, l'un a pris la rage et l'autre est demeuré indemne. Enfin les 8 lapins trépanés avec le virus centrifugé superficiel ont tous résisté.

Expérience IV. — Même expérience le 19 septembre. Centrifugation pendant 1 heure 1/4 à l'aide de l'appareil de Kraüs. Trépanation de 21 lapins. Aucun des 7 lapins inoculés avec la partie superficielle du virus centrifugé n'a pris la rage. Chacun des 2 autres groupes a présenté une atteinte L'animal qui a reçu sous la dure-mère les dernières gouttes des 2 godets à résisté.

Ces expériences semblent montrer que la centrifugation a une certaine action sur le virus rabique. Trois fois sur quatre, — trois fois sur trois même si nous négligeons l'expérience II grevée d'une cause d'erreur, — nous voyons la partie superficielle

du virus centrifugé devenir complètement inactive, ce qui prouve que la rage est bien causée par un agent figuré et non par un contage liquide vivant. Cependant, pour si nets qu'ils soient, les effets de la centrifugation ne sont que moyennement intenses. Dans l'expérience II, nous voyons le liquide superficiel être encore virulent après 1 heure 1/4 de centrifugation. Les lapins inoculés avec le virus profond n'ont présenté qu'une fois sur quatre une mortalité supérieure à celle des lapins qui avaient reçu le virus non centrifugé. Enfin les animaux inoculés avec les dernières gouttes des godets échappent d'ordinaire à l'infection. Il ne semble pas que les choses se passeraient ainsi si le parasite de la rage était un sporozoaire de 0 μ 5 de diamètre, ayant traversé la bougie à la faveur d'un étirement spécial de son protoplasma. La constatation d'une action évidente — quoique peu marquée — de la centrifugation est au contraire en faveur de la nature ultra-microscopique du virus rabique. On conçoit en effet qu'un organisme ayant traversé la bougie à la faveur de ses très petites dimensions centrifugera, mais centrifugera imparfaitement, tout au moins avec un appareil élémentaire tel que celui dont nous disposions. Il est très probable qu'un centrifugeur électrique permettrait d'obtenir avec le virus rabique une centrifugation aussi intense que celle qu'un appareil ordinaire donne avec une culture de choléra des poules, par exemple...

b) On sait que Beijerinck, ayant filtré sur porcelaine des feuilles de tabac atteintes de « mosaïque », parvint à reproduire la maladie avec le suc filtre aussi facilement qu'avec le suc non filtré [1]. Il en conclut que la mosaïque était due à un contage fluide vivant traversant le filtre comme une substance dissoute, et l'expérience suivante lui parut en faveur de cette hypothèse. Des feuilles malades sont triturées et déposées à la surface d'une couche de gélose ; après quelques jours, la couche superficielle est enlevée ; la couche profonde mise à nu contient le virus, puisqu'elle transmet la maladie à des plantes saines. Quoi qu'il en soit de la valeur de cette expérience, ou du moins des conclusions qu'en tire l'auteur [2], il nous a paru intéressant de la reproduire avec le virus rabique de la façon suivante :

1. E. Roux, Sur les microbes dits invisibles, *Bulletin de l'Institut Pasteur* 1903, nos 1 et 2.
2. E. Roux, *loc. cit.*

Autour de tubes à essai renfermant de 2 à 3 travers de doigt de gélatine droite, on fait à l'aide du couteau à verre un trait circulaire à 1/2 centimètre au-dessous du niveau supérieur du milieu nutritif, de façon à rendre ultérieurement facile et rapide la section du tube en cet endroit. Par-dessus la gélatine, on introduit 1 à 2 c. c. d'une émulsion de virus fixe bien aseptique, et on laisse quelques jours en contact à la température de la chambre. Au bout de 2 à 6 jours, l'émulsion est aspirée soigneusement à l'aide d'une pipette, et le tube est sectionné au niveau du trait marqué au couteau. Au moyen d'un fil de platine chauffé, le cylindre de gélatine est alors divisé en 3 disques : 1 disque supérieur qui, souillé par l'émulsion, est rejeté; 1 disque inférieur adhérent au tube à essai et rejeté également, enfin 1 disque intermédiaire, soigneusement préservé au cours des opérations précédentes, de toute contamination par le virus. Ce dernier disque est recueilli dans un verre flambé, liquéfié rapidement à l'étuve à 37° et injecté, après trépanation, sous la dure-mère d'un lapin. Sur 6 animaux inoculés, aucun n'a présenté ni rage ni phénomène pathologique d'aucune sorte. Le virus rabique n'a donc pas diffusé dans la masse de la gélatine à la façon d'une substance soluble. Il n'est donc pas dû à un *contagium vivum fluidum*, pour employer l'expression de Beijerinck. Du reste, le fait que le virus rabique est complètement arrêté par les bougies Berkefeld N et Chamberland F était déjà bien peu en faveur de cette hypothèse. Les expériences de centrifugation relatées plus haut lui sont complètement opposées.

c). Il reste que la rage soit causée, comme la fièvre aphteuse, la péripneumonie, la peste bovine, la fièvre jaune, par un organisme ultra-microscopique. C'est de beaucoup l'hypothèse la plus vraisemblable, et c'est à elle que nous nous arrêterons. Que pouvons-nous supposer des caractères de cet organisme?

Il importe tout d'abord de faire remarquer qu'organisme ultra-microscopique ne veut pas nécessairement dire : bactérie, puisque le *Micromonas Mesnili* de Borrel, qui est à la limite de la visibilité, traverse les filtres; puisque Finlay a émis l'hypothèse que la cause de la fièvre jaune résidait dans un hématozoaire ultra-microscopique. Il est toutefois plus probable que l'agent pathogène de la rage n'est pas un protozoaire, mais un microbe voisin du microbe de la péripneumonie de Roux et Nocard. Ce

dernier microorganisme traverse Chamberland F. L'agent pathogène de la rage est de dimensions plus considérables puisqu'il est arrêté par elle. Cependant le microbe de Roux et Nocard est — quoique très imparfaitement — visible au microscope, et le microbe de la rage est invisible aussi bien dans le filtrat que dans toutes les autres conditions. Il y a là une contradiction dont il faut sans doute demander l'explication à ce fait que le virus péripneumonique est « mobile » (Roux et Nocard), « très mobile » (Cotton et Mouton), tandis que le virus rabique serait immobile ou tout au moins très peu mobile. Ce défaut de mobilité entraînerait pour l'agent pathogène de la rage une difficulté plus grande à la fois de passage à travers les bougies et de visibilité au microscope. Comme dimensions et comme immobilité, le virus rabique paraît se rapprocher du virus aphteux qui traverse Chamberland F et non B, et surtout du virus claveleux qui, retenu par F, passe à travers F^4 et F^5. Il paraît agir dans l'organisme infecté non seulement par sa multiplication, mais encore par la toxine qu'il secrète (de Blasi et Russo-Travali, Babès). Nous nous proposons de revenir sur ce point. Enfin l'influence que paraît avoir sur la filtration du virus la très fine trituration du système nerveux est un argument en faveur du siège intra-cellulaire du microorganisme.

Il nous reste à souhaiter que des perfectionnements à la méthode de MM. Siedentopf et Zsigmondy permettent bientôt d'établir si ces hypothèses sont fondées on non.

En terminant, il nous plaît de faire remarquer que si le passage du virus rabique à travers la bougie Berkefeld est, comme nous le croyons, de nature à faire admettre les dimensions ultra-microscopiques du parasite de la rage, ce n'est que la confirmation d'une idée émise dès 1881 par M. Pasteur.

Constantinople, le 12 octobre 1903.

ANAÉROBIES ET SYMBIOSE

PAR LE Dr BIENSTOCK, DE MULHOUSE (ALSACE).

Ces questions, touchées par Pasteur pour la première fois il y a quarante ans, après avoir été négligées pendant très longtemps, ont été reprises dans ces dernières années, dans bieu des travaux nouveaux. La symbiose naturelle des anaérobies de la putréfaction avec les aérobies, et leur travail commun pour dissoudre la matière organique morte et la rendre utilisable de nouveau, ont été expliqués par Pasteur, en disant que l'action des anaérobies n'est possible que quand les bactéries aérobies leur ont procuré le terrain nécessaire à leur développement, par l'absorption de l'oxygène existant et par l'éloignement de l'oxygène nouveau.

De nombreux savants ont cherché depuis quelques années à vérifier la justesse de l'hypothèse de Pasteur. Kedrowsky[1], par exemple, attribue le phénomène à une substance de nature indéterminée produite par les aérobies, un « ferment », dont il cherche à démontrer la présence par l'expérience suivante : il tue, par le chloroforme, de la sarcine cultivée sur de la gélose inclinée, et ensemence sur ces cultures mortes, du *clostridium butyricum* ou du bacille du tétanos ; il obtient un développement de ces anaérobies. Mais si le bouillon est débarrassé de ses cultures aérobies par filtration, après avoir été précipité par l'alcool, il ne se produit pas de développement d'anaérobies. Scholz[2] et Matzuschita[3] ont recommencé sans succès ces essais de Kedrowsky, et sont revenus à l'hypothèse de Pasteur. Il y a quelques mois, v. Oettingen[4] a donné une nouvelle explication de ce fait, par une expérience qu'il appelle : « Symbiose séparée. » Pour simplifier les choses, il ne travaille qu'avec le bacille du tétanos et le *Staphylococcus aureus*. Dans deux tubes communiquants il ensemence, d'un côté le bacille

1. KEDROWSKY, *Zeitschrift f. Hygiene*, B. XX, 1895.
2. SCHOLZ, *Zeitschrift f. Hygiene*, B. XXVII, 1898.
3. MATZUSCHITA, *Zeitschrift f. Hygiene*, B. XLIII, 1902.
4. V. OETTINGEN, *Zeitschrift f. Hygiene* B. XLIII, 903

du tétanos, de l'autre le *Staphylococcus aureus* et il ferme. Le tube du *Staphylococcus* se peuple très abondamment, et bien qu'il absorbe l'oxygène, le bacille du tétanos n'arrive pas à se développer. Au contraire, s'il introduit de l'hydrogène dans les tubes, ou s'il verse un peu de bouillon du *staphylococcus* dans l'autre tube, il obtient aussitôt la culture du tétanos.

M. v. Oettingen imite aussi les expériences de Kedrowsky. Il tue le *Staphylococcus* par la lumière du soleil, par la chaleur de 55°, par le chloroforme, par la lumière diffuse du jour, puis il verse le bouillon des *Staphylococcus* dans le tube du tétanos, sans que ceux-ci se développent. En centrifugeant longtemps les tubes du *Staphylococcus*, il obtient des couches supérieures, claires et stériles, qui devraient contenir le ferment de Kedrowsky. Il verse ces couches supérieures dans le tube du tétanos; le résultat reste néanmoins négatif. S'il se produisait, ce qui est rare, un développement du tétanos, c'est qu'il s'était glissé des *Staphylococcus* dans le bouillon.

M. v. Oettingen en conclut que ni l'hypothèse de Pasteur, ni celle de Kedrowsky ne pouvait exqliquer le phénomène. Il voit l'agent essentiel dans l'aérobie *vivante*. L'imparfaite puissance d'oxydation de l'anaérobie trouve à tout moment dans l'aérobie un coopérateur énergique, qui consomme avidement l'oxygène. Ce ne sont pas les aérobies qui produisent, comme le suppose Kedrowsky, le ferment que le filtre arrête, ce sont les aérobies elles-mêmes, qui sont le ferment organisé et retenu par le filtre; v. Oettingen conclut de ses essais que tout espoir a disparu à jamais d'obtenir un terrain de culture sur lequel puissent se développer les microorganismes anaérobies en cultures pures à l'air.

Mes recherches récentes me permettent de croire que cette opinion de v. Oettingen est excessive. Cette question de la symbiose entre les anaérobies de la putréfaction et les aérobies m'occupe depuis des années. Depuis que j'ai étudié [1] en 1899, à l'occasion de mes travaux sur le *B. putrificus*, son action sur les substances albuminoïdes en culture mixte avec les bactéries aérobies, je n'ai plus perdu de vue cette question. Pendant toutes ces dernières années j'ai fait travailler mon *Putrificus* symbiotiquement avec un très grand nombre de bactéries aérobies, dont je ne veux citer que les suivantes :

Proteus vulgaris, *Proteus mirabilis*, *Proteus Zenkeri*, *B. fluorescens liquefaciens et putidus*; *B. pyogœnes fœtidus*, *B. ureæ*, *B. subtilis*, *B. mesentericus vulgatus et niger*, *B. radiol*, les différents *Tyrothrix*, *B. pyocyaneus*, *B. butyricus Hueppe*, *B. coli*, *B. lactis aerogenes*, *B. du lait bleu*, *B. du lait rouge*, *B. denitrificans*, *B. typhi*, *B. paratyphi*, B. de la diphtérie, pneumobacille de Friedlander;

B. du rouget de porc, B. de la peste porcine, B. de la pneumo-entérite du porc, B. du choléra des poules, *Vibrio choleræ*, *Spirillum Finkler*, *Spirillum tyrogenum Deneke*, *Vibrio phosphorescens*, *Micrococcus tetragenus*, *Staphylococcus albus*, *aureus citreus*, et divers streptocoques, etc.

Je procédais ordinairement de la manière suivante : je stérilisais des flocons de fibrine, bien lavée et blanche, dans le liquide d'Uschinsky, et j'y ensemençais des aérobies. Après quelques jours j'ajoutais le *Putrificus*. J'avais observé qu'il y a, parmi les aérobies, des espèces à l'aide desquelles le développement de l'anaérobie et la putréfaction de la fibrine se produisent rapidement, et d'autres ne nuisant pas au développement du *Putrificus*, mais entravant son activité putréfiante.

J'étendis aussi mes essais à d'autres anaérobies, au vibrion septique, au bac. du tétanos, au B. du charbon symptomatique, au *B. botulinus*, au *B. cadaveris sporogenes* de Klein, au *B. enteridis sporogenes*, aux 3 *B. de Rodella* isolés de l'intestin des nourrissons, au *B. bifidus* de Tissier, au *B. bifermentans* de Tissier; de sorte que j'ai pour ainsi dire travaillé avec la plupart des espèces anaérobies bien caractérisées. J'ai cherché le ferment de Kedrowsky dans toutes les cultures aérobies citées plus haut. Ces travaux durent naturellement des années, chez un médecin pratiquant, forcé de les interrompre à tout instant.

J'ai passé les diverses cultures en bouillon à travers le filtre. Je les ai détruites de différentes façons. Mes résultats ont été tout aussi négatifs que ceux des autres chercheurs. Je ne vis se produire la putréfaction que dans un travail commun du *Putrificus* et des aérobies vivantes.

Je ne découvris qu'une exception, et, sous de certaines conditions, celle du *B. pyocyaneus* de Gessard.

Si de la fibrine est infectée par le *Pyocyaneus* dans le liquide

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1890 et 1904.

d'Uschinsky-Fraenkel, auquel on a ajouté 1 à 2 0/0 de sucre, il se montre après quelques jours un changement dans la contexture et dans la consistance de la fibrine. Elle perd sa couleur blanche, se gonfle, devient brunâtre, un peu vitreuse. Auparavant serrée et solide, elle est à présent flasque, et se laisse facilement couper par le fil de platine, ce qui n'était pas possible avant l'ensemencement.

C'est le moment propice pour expérimenter. Si l'on tue maintenant le *Pyocyaneus* en le portant à 100°, et que l'on ensemence le tube avec le *Putrificus*, il se produit, après 1, 2 à 3 jours, sans qu'aucune des conditions anaérobies ait été créée, le développement de cette anaérobie absolue, qui se fait aussitôt remarquer par l'apparition de grandes bulles de gaz putrides. On ne remarque tout d'abord au microscope que de rares bâtonnets longs et grêles du *Putrificus*. Bientôt ils augmentent en nombre, et les jours suivants on voit déjà beaucoup de baguettes de tambour caractéristiques. Les petits bâtonnets du *Pyocyaneus* mort ne prennent pas la coloration aussi bien que les formes du *Putrificus;* ils deviennent, de jour en jour, plus difficiles à colorer, ne forment bientôt plus qu'une masse diffuse, presque incolore; finalement, ils ont complètement disparu, et l'on a au microscope l'image d'une culture pure du *Putrificus*.

Naturellement, je me suis entouré dans toutes ces expériences de toutes les mesures nécessaires de contrôle. Je me suis dit d'abord que la cuisson de la culture du *Pyocyaneus* présentait déjà par elle-même des conditions anaérobies suffisantes pour pouvoir permettre le développement du *Putrificus*. Il est connu qu'il peut se produire parfois une croissance d'anaérobies dans du bouillon ensemencé aussitôt après la cuisson. De toute façon, cela se produit assez rarement, même après un ensemencement copieux. Pour éviter cette incertitude d'interprétation, je n'ai inoculé le *Putrificus* que 15 jours après avoir tué le *Pyocyaneus*.

Dans les cas où j'inoculais peu de temps après la stérilisation, je tirais, en les infectant, les flocons de fibrine un moment du liquide avec le fil de platine, pour faire pénétrer de l'air dans le bouillon.

J'ai aussi exclu la possibilité que le sucre ajouté pût être la cause adjuvante du développement de l'anaérobie.

Le *Putrificus* ne se développait jamais dans le milieu nutritif, préparé et inoculé sous les mêmes conditions, mais sans être précédé de l'action des *Pyocyaneus*.

Je contrôlais ces essais de la manière suivante : après avoir tué la culture du *Pyocyaneus* sur fibrine, j'en ensemençais sur de la gélose inclinée et sur du bouillon; je recommençais après l'ensemencement du *Putrificus*, et, aussitôt que les premières bulles de gaz putrides s'élevaient, j'inoculais à l'air sur de la fibrine dans de la solution d'Uschinsky, avec et sans sucre, qui, naturellement, devait rester inaltérée et claire, et à la fin de la putréfaction, je faisais une culture en piqûre pour être sûr que l'anaérobie existait encore en culture pure, sans avoir été contaminée par des aérobies accidentelles.

Il faut aussi remarquer ce qui suit : pour cet essai, il faut toujours infecter un grand nombre de tubes avec le *Pyocyaneus*. Quoique tous les tubes soient tenus sous les mêmes conditions, et que leur infection provienne de la même culture du *Pyocyaneus*, l'altération de la fibrine ne se produit pas de manière égale dans tous les tubes. Je n'ai pu savoir pourquoi. De même, on sait que la formation de la couleur du *Pyocyaneus* n'est pas toujours égale dans les mêmes conditions. Dans à peu près la moitié des tubes, la contexture ferme de la fibrine ne se modifie pas, malgré le développement du *Pyocyaneus*. Ces tubes sont inutilisables pour les essais avec les anaérobies. On n'y peut obtenir la croissance des anaérobies après la stérilisation du *Pyocyaneus*. D'un autre côté, il faut la présence de la fibrine pour la réussite de l'essai. Si la fibrine, altérée par le *Pyocyaneus* est retenue par le filtre après la destruction de l'aérobie, et que le liquide seul soit infecté, le *Putrificus*, ne se développe pas.

J'ai obtenu le même développement de l'anaérobie sans conditions anaérobies de la manière suivante : j'infectais du liquide d'ascite stérile avec le *Pyocyaneus*, et après 4 ou 6 semaines d'étude, je le distribuais dans des tubes et le stérilisais. Si l'on ensemence le *Putrificus* dans le liquide se trouvant au-dessus de l'albumine coagulée, il se développe, et l'albumine se putréfie rapidement.

Si l'on répète cette expérience sans avoir semé d'abord le *Pyocyaneus* ou une aérobie autre que le *Pyocyaneus*, toute

croissance du *Putrificus* est exclue. Si l'on infecte le liquide sans le coagulum, le *Putrificus* ne se développe également pas. Ainsi, dans cet essai comme dans celui avec la fibrine, la présence de l'albumine coagulée est nécessaire pour la réussite de l'expérience.

Je répétai ces essais avec d'autres anaérobies. Ils ont réussi avec un *putrificus* de Tissier, avec le *B. cadaveris sporogenes* de Klein, le *B.* d'œdème malin, le B. du charbon symptomatique, le *B. botulinus*, avec le B. III de Rodella, qui ressemble au vibrion septique. Ils n'ont pas réussi avec le B. du tétanos, le *B. enteritidis sporogenes Klein*, le *Bifidus* de Tissier, le *Bifermentans* de Tissier, le *Perfringens*, les B. II et I de Rodella.

Si l'on compare le premier groupe de ces bactéries au second, on voit qu'il s'agit, dans le premier groupe, d'anaérobies qui décomposent l'albumine exactement comme le *Putrificus* et avec les mêmes produits de dislocation, tandis que les bactéries du second groupe, au moins dans les races qui sont à ma disposition, n'exercent pas d'action putréfiante.

Peut-être faut-il y chercher l'explication de la non-réussite des expériences citées plus haut.

La question, touchée au commencement de ce travail, n'est certainement pas encore résolue, mais a au moins avancé un peu par mes recherches récentes.

On sait depuis longtemps que des bactéries anaérobies obligées peuvent-être cultivées à l'air, dans un terrain de culture liquide, et qu'elles ne sont même pas entravées dans leur développement par le passage lent et continu de l'oxygène, si elles agissent symbiotiquement avec n'importe quelle sorte d'aérobie, mais vivante.

D'un autre côté on voit par mes expériences qu'une espèce déterminée et ubiquitaire livre des produits qui rendent inutile, pour les anaérobies putréfiantes, la symbiose avec des aérobies.

Parlà l'hypothèse de Pasteur, que les anaérobies de la putréfaction ne peuvent commencer leur œuvre dans la nature que quand elles se trouvent accompagnées d'aérobies, consommant l'oxygène ennemi, perd tant soit peu de sa valeur.

Des travaux ultérieurs auront à rechercher quelle est la substance qui rend possible aux anaérobies leur vie à l'air sans symbiose avec des aérobies.

Quelques coïncidences vous rappellent la *Pyocyanase* d'Emmerich et de Loew.

La pyocyanase dissout la fibrine. Nous n'avons vu se produire les faits décrits que quand la fibrine commence à se dissoudre dans la culture liquide du *Pyocyaneus*. La pyocyanase est très résistante à la chaleur, une cuisson même de plusieurs heures ne diminue pas son activité. Nous avons également vu que, malgré la stérilisation répétée du *Pyocyaneus*, la substance qui fournissait le terrain propre au développement des anaérobies n'était pas détruite.

ÉTUDES D'HYDROGRAPHIE SOUTERRAINE

PAR E. DUCLAUX

(*Suite*. V. p. 523 et 640.)

VIII

TERRAINS PRIMITIFS ET VOLCANIQUES

En continuant autour du Cantal le tour que nous avons commencé, nous rencontrons un secteur que je tiens à séparer du reste : c'est celui qui va de la vallée de l'Alagnon à celle du Goul, en traversant celle de l'Epie, et qui embrasse la partie la mieux caractérisée, la Planèze. Sa moitié Est, qui va de l'Alagnon à l'Epie, est cet éclat de vitre triangulaire, portant le Plomb du Cantal à son angle supérieur, et qui s'étend en pente douce jusqu'à Saint-Flour comme capitale et jusqu'aux limites du département. C'était, au temps de Dufrénoy et Elie de Beaumont, la démonstration classique de ce que pouvait être un cratère de soulèvement, un solide coup de coude appliqué au centre de la vitre qu'était la masse volcanique, car dans cette théorie singulière la matière avait précédé la forme et préexistait au soulèvement. Il ne faut pas dire trop de mal de cette doctrine, que la science a trop abandonnée après l'avoir trop prônée, car nous la retrouvons, très réduite, il est vrai, dans les dislocations qu'a subies notre toit intérieur de dépôts calcaires. Avant ou pendant la durée du volcan, les grands fragments de cette nappe, pour lesquels le mot *d'éclats de vitre* semble mieux fait que pour les masses volcaniques, se sont brisés et diversement inclinés. Il est sûr que dans les vallées du Goul, de la Cère, de la Jordanne, de l'Authre, pour ne parler que de celles que je connais bien, il y a beaucoup plus de sources, et plus abondantes, sur le flanc nord que sur le flanc sud de la vallée, et que par conséquent la couche profonde ne se soit un peu inclinée dans le sens par où les eaux s'écoulent de préférence. Il serait même intéressant de rechercher, par une étude plus précise des niveaux, si ce dénivellement par

bascule, d'un côté qui s'abaisse pendant que l'autre s'élève, ne daterait pas du moment où le cratère s'est ouvert, et s'il n'y avait pas là les germes du creusement et de l'existence des vallées actuelles. Le *facies* général du Cantal daterait dans ce cas du coup de coude qui l'a créé.

Le même coup y a déposé aussi les germes de son histoire agricole future. Les prairies (je parle des prairies naturelles avec irrigation) commencent au toit de 700 mètres, là où il existe. Plus bas, elles sont plus arrosées que si le toit intérieur n'existait pas. Plus haut, sur tous les flancs du Cantal, elles ne bénéficient de sa présence que parce que l'atmosphère est plus humide. Mais elles donnent une idée assez juste de ce que serait le Cantal si le coup qui l'a créé, au lieu de porter sur un des bords du plateau calcaire, avait porté en plein gneiss. Le Planèze est l'image exacte de ce que serait le Cantal sans calcaire. Sur les hauteurs, au voisinage du Plomb, ce sont les mêmes pâturages, la même *montagne* que partout, un peu moins humide que plus à l'Ouest, à cause de la direction des vents pluvieux. Plus bas, jusqu'à la hauteur de 1000 mètres, c'est la montagne, c'est-à-dire la prairie sans coupes, qui est le mode d'exploitation de beaucoup le plus général. Au-dessous, c'est la culture qui peut se passer d'eau en été, les céréales; aux hauteurs où partout dans le Cantal la prairie domine, en Planèze ce sont les moissons, que le terrain soit du gneiss ou de la lave.

C'est que, très différents de nature, ces terrains se ressemblent au point de vue agricole. Ils sont tous deux très perméables pour la pluie. Quand, partant de Saint-Flour, placé à la base de l'éclat de vitre dont je parlais tout à l'heure, on se dirige vers Chaudesaigues, la route borde longtemps la ligne de séparation d'une couche de basalte des plateaux et du terrain primitif. Cette ligne marque visiblement, sur la carte géologique, la cassure inférieure de l'éclat triangulaire dont le sommet porte le Cantal. Mais rien n'avertit le voyageur. Les deux terrains se fondent l'un dans l'autre, et leurs contours aussi. L'eau est aussi rare d'un côté que de l'autre. Il n'y a quasi pas de ruissel-

1. Les cartes de l'état-major sont insuffisantes. Il faudrait opérer avec les minutes, qui sont au 1/20.000. Ayant demandé officiellement le tirage d'une épreuve pour le Cantal, qu'on donne aux officiers, on m'a répondu en me parlant de la défense nationale: je n'étais pas assez pervers pour la compromettre en cherchant les origines lointaines du Cantal, et je n'ai pas insisté.

lement, la pluie et la neige sont absorbées sur place. Les habitations, rares, recherchent la ligne de contact des deux sols, parce que c'est là qu'elles rencontrent de préférence les eaux qui ayant coulé sous la couche de laves, rencontrent l'ancien sol gneissique, et forment des sources à leur réapparition. Bouzentes, les Ternes, Sériers, Lavastrie, Cordesse, Oradour, Pierrefort sont ainsi rangés le long de cette ligne de contact de deux terrains, devenue, par des conditions naturelles, la ligne de restitution à un bief inférieur des eaux tombées d'un niveau supérieur. C'est, si on veut, quelque chose d'analogue au niveau de 700 mètres que nous avons rencontré sur l'autre versant, mais sans sa régularité ni sa puissance.

On pourrait relever les mêmes faits dans tous les pendentifs en basalte des plateaux, appliqués sur les flancs de la montagne. Je n'insiste pas, cet ordre d'idées ne nous intéresse que par ses connexions avec la composition des eaux. Si je montre en effet que les eaux qu'on rencontre en pays de gneiss ont à peu près la même composition que dans le terrain volcanique, on comprendra qu'avec la même origine, la même quantité et à peu près les mêmes qualités, elles ne peuvent pas s'inscrire dans le *facies* agricole. Je citerai un seul exemple, dans lequel on passe du terrain volcanique au terrain de micaschistes et de gneiss. Je pars de Saint-Flour, assis au bord d'une terrasse de basalte, pour arriver d'abord à Cordesse, placé sur l'autre bord de la coulée, puis à Chaudesaigues, de l'autre côté de la Truyère, rivière dont la vallée occupe le fond de toute la partie gneissique du département.

Nos d'ordre.	Origine.	Alt.	Dates.	Tempre.	Résidu.	Chaux.	Sel maris.
—	—	—	—	—	—	—	—
225	Saint-Flour	883	24.IX.99	16,0	224	14	8,0
226	Le Pirou	880	24.IX.99	17,0	52	3	7,0
227	La Gazelle	—	24.IX.99	13,3	44	2	2,0
228	Bouzentès	995	25.IX.99	10,5	121	23	5,0
229	Les Ternes	994	25.IX.99	10,2	126	21	2,0
230	Peyrelade	1,008	25.IX.99	11,1	96	13	6,0
231	Cordesse	910	25.IX.99	9,8	94	13	5,0
232	Pont de Laneau	648	25.IX.99	11,6	50	5	4,0
233	Chaudesaigues	670	26.IX.99	13,2	45	7	6,0
234	Truyère	700	24.IX.99	15,0	23	5	4,0
235	R. de Bournoncles	—	24.IX.99	12,9	28	3	4,0

Observations. — **225**, eaux de Saint-Flour. — **226**, petite source à gauche de la route en allant au Piron. — **227**, source de M. de Vaissière, amenée de 2,500 mètres. — **228**, **229**, **231**, source des localités. — **230**, puits à fleur de sol. — **232**, source de l'auberge. — **233**, source du Lys. — **234**, **235**, rivières au pont de Garabit.

Si on laisse de côté les nos 225 et 227, sources venues de loin, on voit que les sources du gneiss ont même composition que les eaux des terrains volcaniques, avec des chiffres sensiblement plus faibles. L'étude des deux dernières rivières, qui toutes les deux ont coulé sur du gneiss, montre que les choses se passent comme dans la vallée de la Cère. L'eau est encore moins chargée que les eaux de sources. Il faut en effet tenir compte avec elles des eaux de pluie qui n'ont rien dissous sur leur passage.

Il est facile de résumer ce que nous venons d'apprendre au sujet des mouvements de l'eau dans le terrain volcanique du Cantal. Dès que les pluies sont tombées, elles pénètrent; il y a peu du ruissellement. La nourriture des rivières se fait surtout par les sources. Dans ces sources, il vient à la fois de l'eau superficielle, qui a séjourné et circulé dans les couches meubles voisines de la surface et dans le tapis de végétation qui leur sert de couvert, et les eaux plus profondes qui entrent dans la roche perméable et y commencent un voyage qui peut durer longtemps, des mois et peut-être des années. Pendant ce contact de durée très variable, les éléments du sol se dissolvent; mais comme ils sont très résistants, l'eau en entraîne peu et n'agrandit pas beaucoup les espaces dans lesquels elle circule. Par suite, les sources sont stables et conservent leur pouvoir filtrant. Comme il reste de l'argile à la place des portions les plus attaquables de la roche, et que les mouvements de l'eau sont lents, il n'y a pas de *nettoyage* des surfaces filtrantes, et pourtant celles-ci ne s'encrassent pas.

Il est probable, mais il y a matière sur ce point à un travail que j'ai à peine ébauché, que les quelques germes qu'on rencontre dans les sources viennent des parties superficielles, et non des parties profondes des eaux qui viennent s'y réunir. Quoi qu'il en soit, le pays a ceci de bon au sujet de la collecte et de l'origine des eaux, c'est qu'on sait toujours d'où vient tout filet d'eaux qu'on cherche à utiliser. Du moins n'ai-je jamais

éprouvé d'embarras à ce sujet : quand l'analyse me signalait un excès de calcaire, de sel marin, de matière organique, je trouvais toujours à petite distance, en amont, de quoi expliquer l'irrégularité. Les lignes de plus grande pente sont celles d'un cône circulaire dont l'axe est plus ou moins vertical.

Les choses se passeraient suivant ce schéma sur toute la surface de la masse volcanique si ce terrain n'avait pas de base, c'est-à-dire ne reposait pas sur un terrain différent. Sur la moitié ouest, c'est la couche calcaire que nous avons appelée niveau de 700 mètres, et qui, imperméable ou peu perméable, arrête, divise les sources qui viennent affleurer dans l'épaisseur des massifs, et en fait des sources plus abondantes venant jaillir dans des points privilégiés, et donnant à certaines vallées leur parure et leur richesse. Sur la moitié regardant vers l'orient est la lèvre surélevée de la fente qui a vomi le volcan, et celle-ci empêche, dans une mesure plus faible que la couche de 700 mètres, la descente des pluies tombées sur les basaltes qui lui servent de revêtement, et amène la guirlande de sources auxquelles sont suspendus les villages de la Planèze, comme Olmet et les villages voisins le sont à la frange de calcaire qui apparaît dans la vallée de la Cère.

TABLE DES MATIÈRES

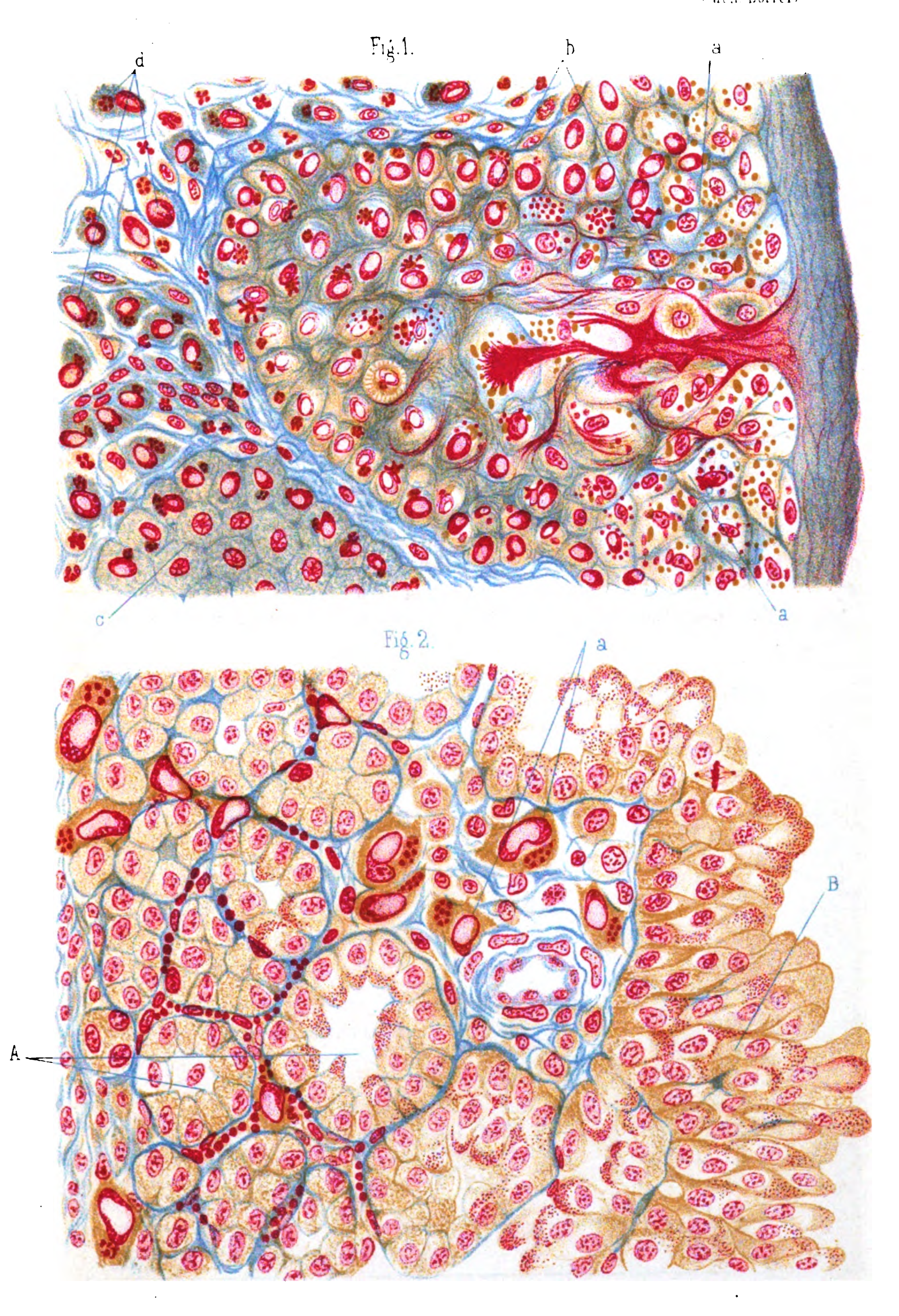
TABLE ALPHABÉTIQUE PAR NOMS D'AUTEURS

REVUES ET ANALYSES

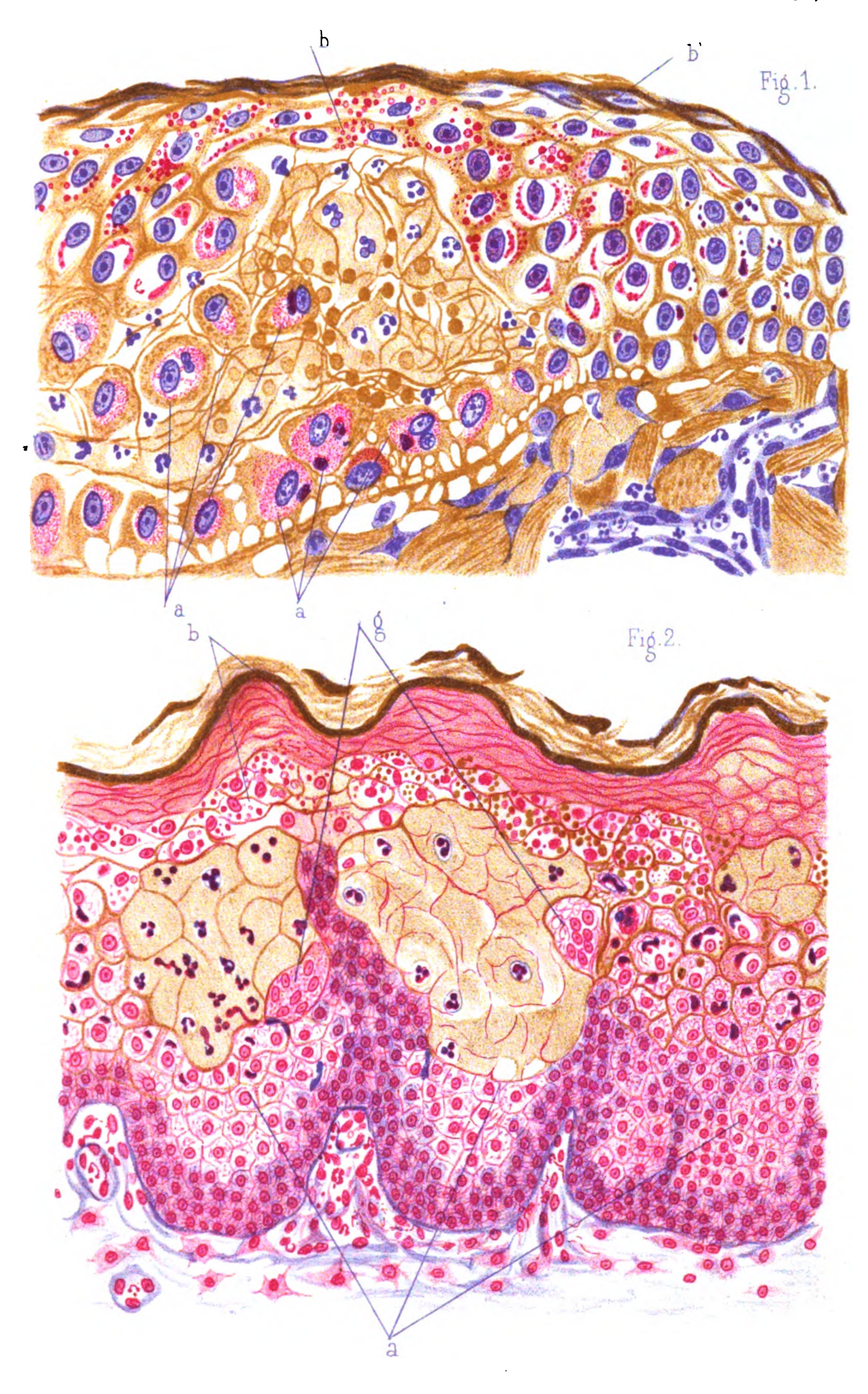
TABLE DES PLANCHES

Le Gérant : G. MASSON.

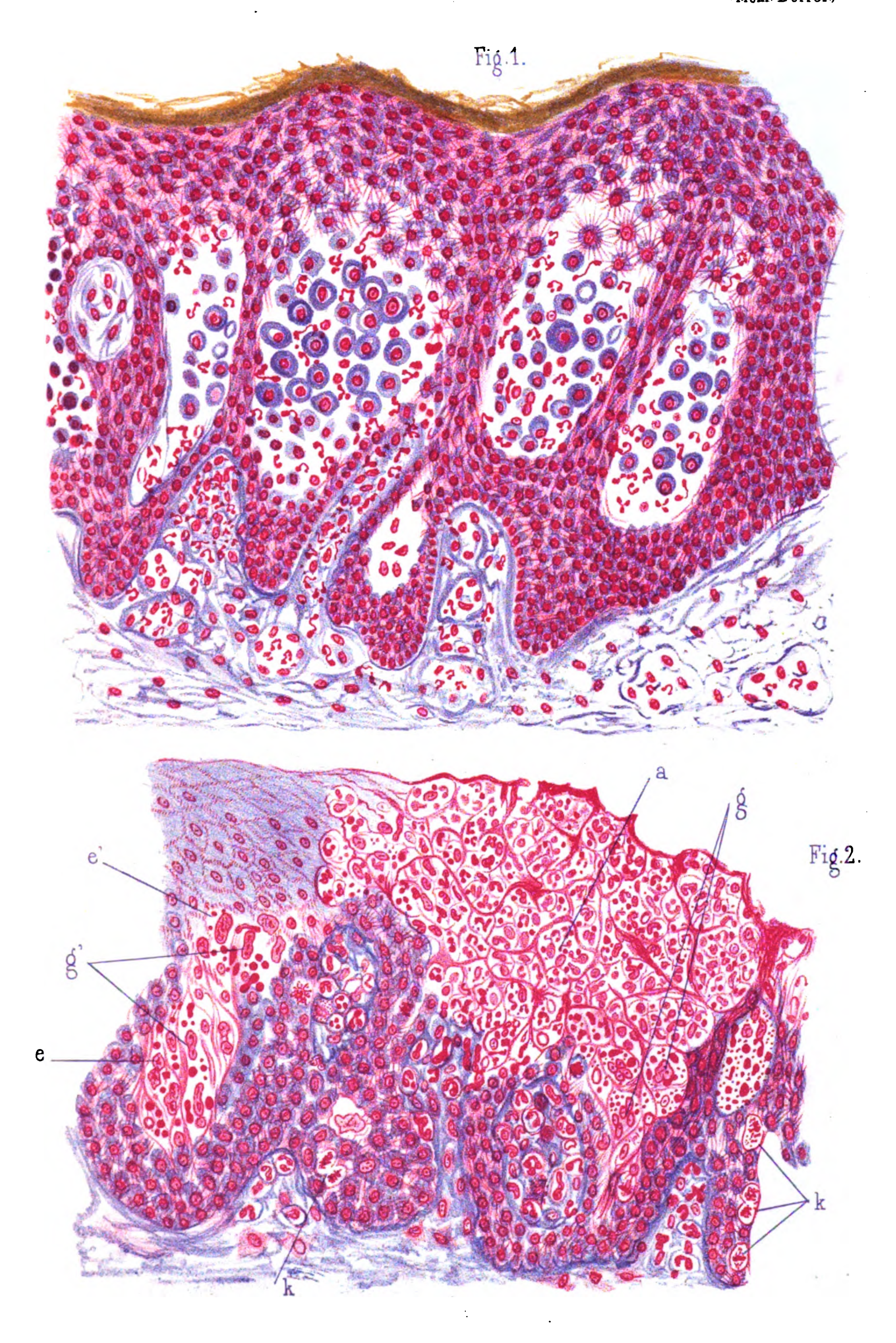
Sceaux. — Imprimerie Charaire.



Dr Borrel del.
V. Roussel lith.
Imp. L. Lafontaine Paris.



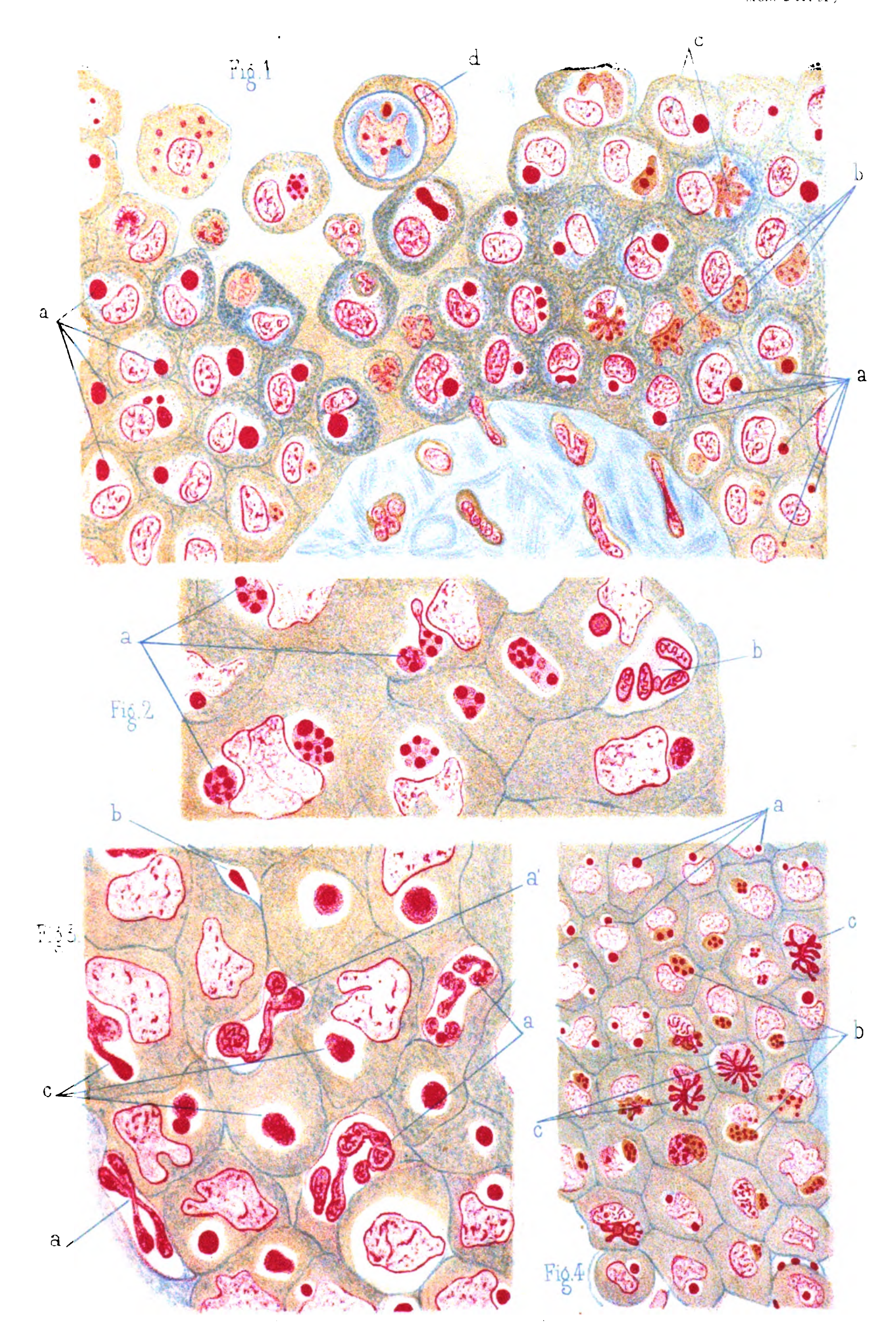
Dr Borrel, del.
V. Roussel lith.
Imp. L. Lafontaine, Paris.



Dr Borrel, del.

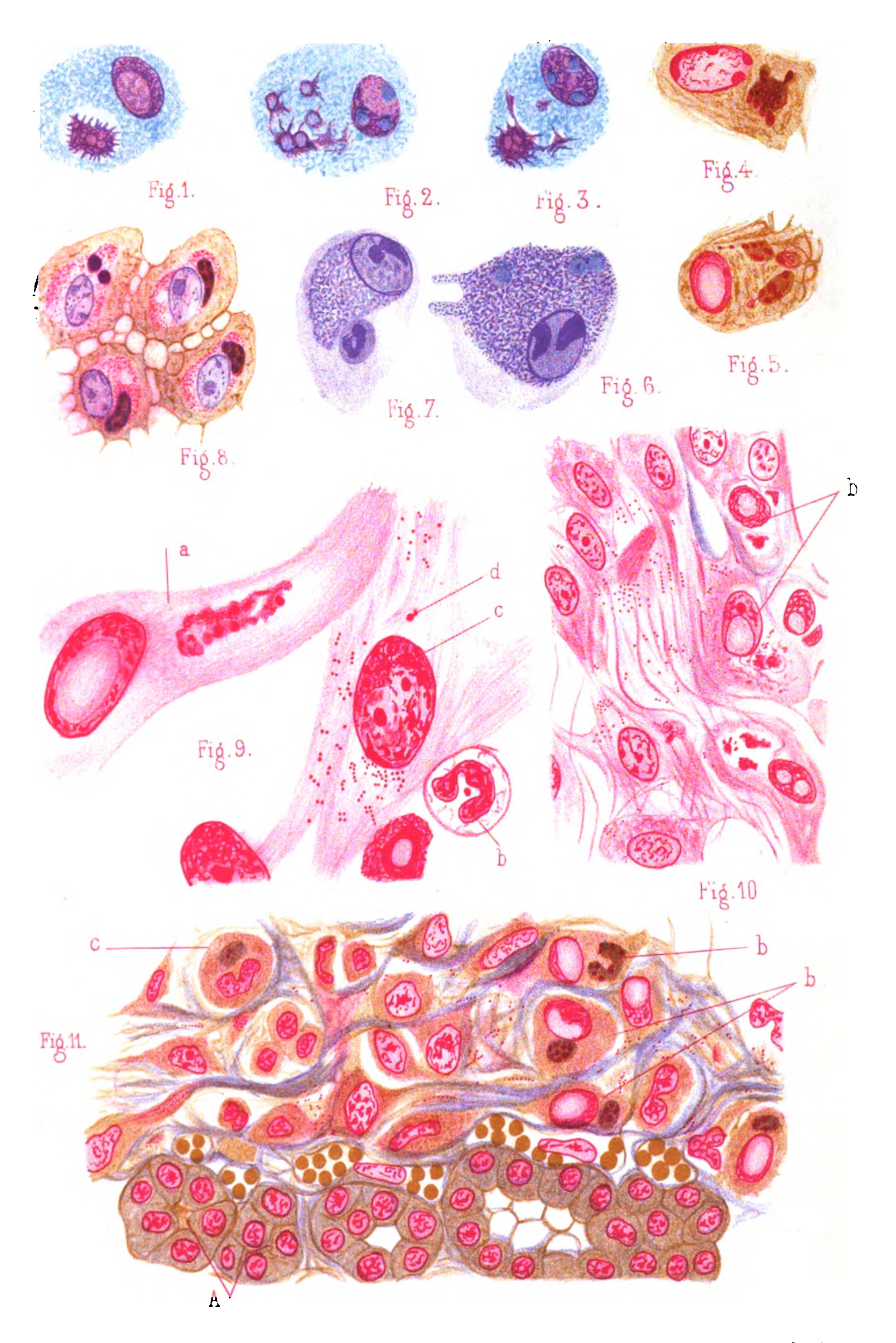
V. Roussel, lith.

Imp. L. Lafontaine, Paris.



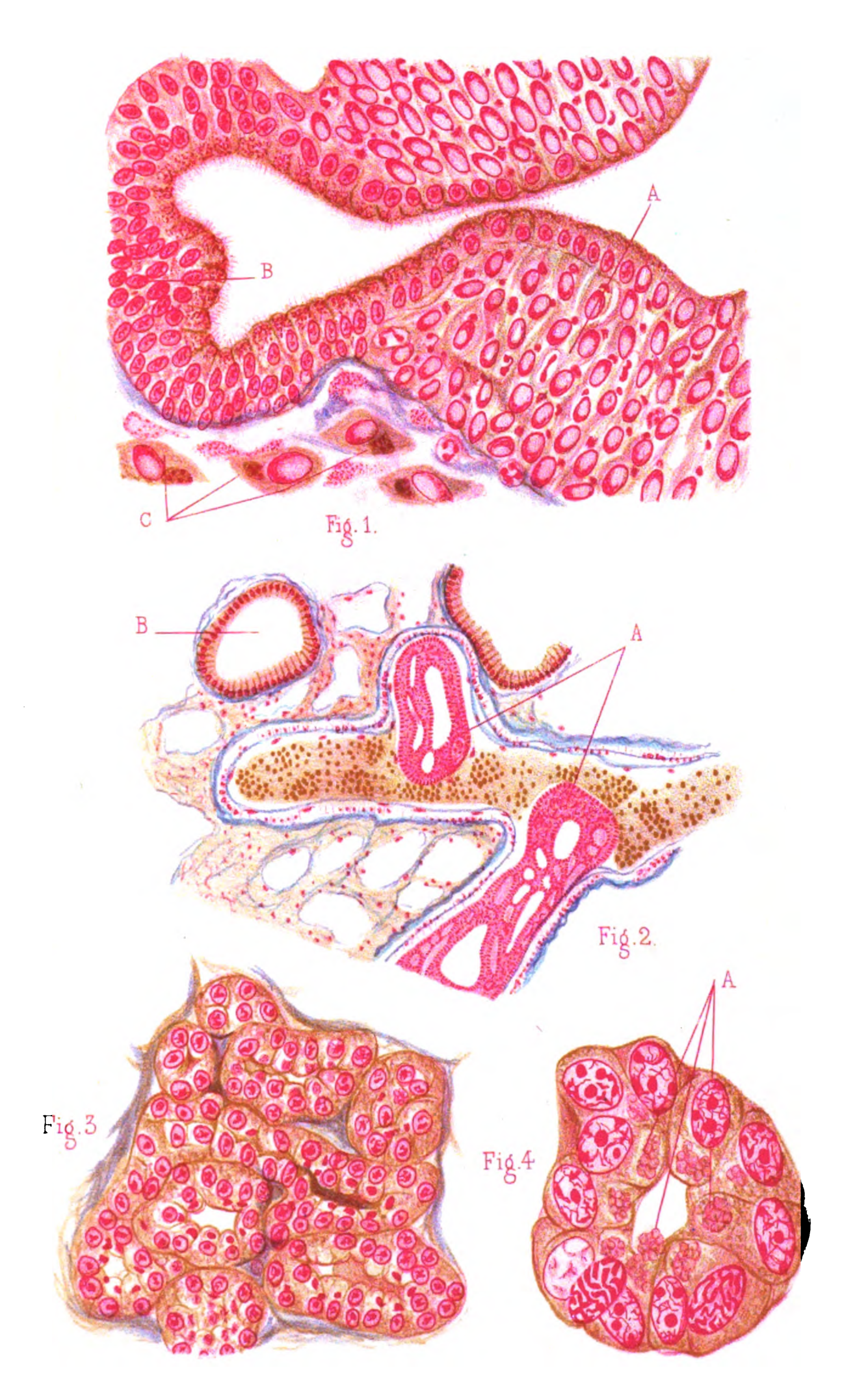
Dr Borrel del.
V. Roussel, lith.

Imp. L. Lafontaine Paris.



Dr Borrel, del. V. Roussel, lith.

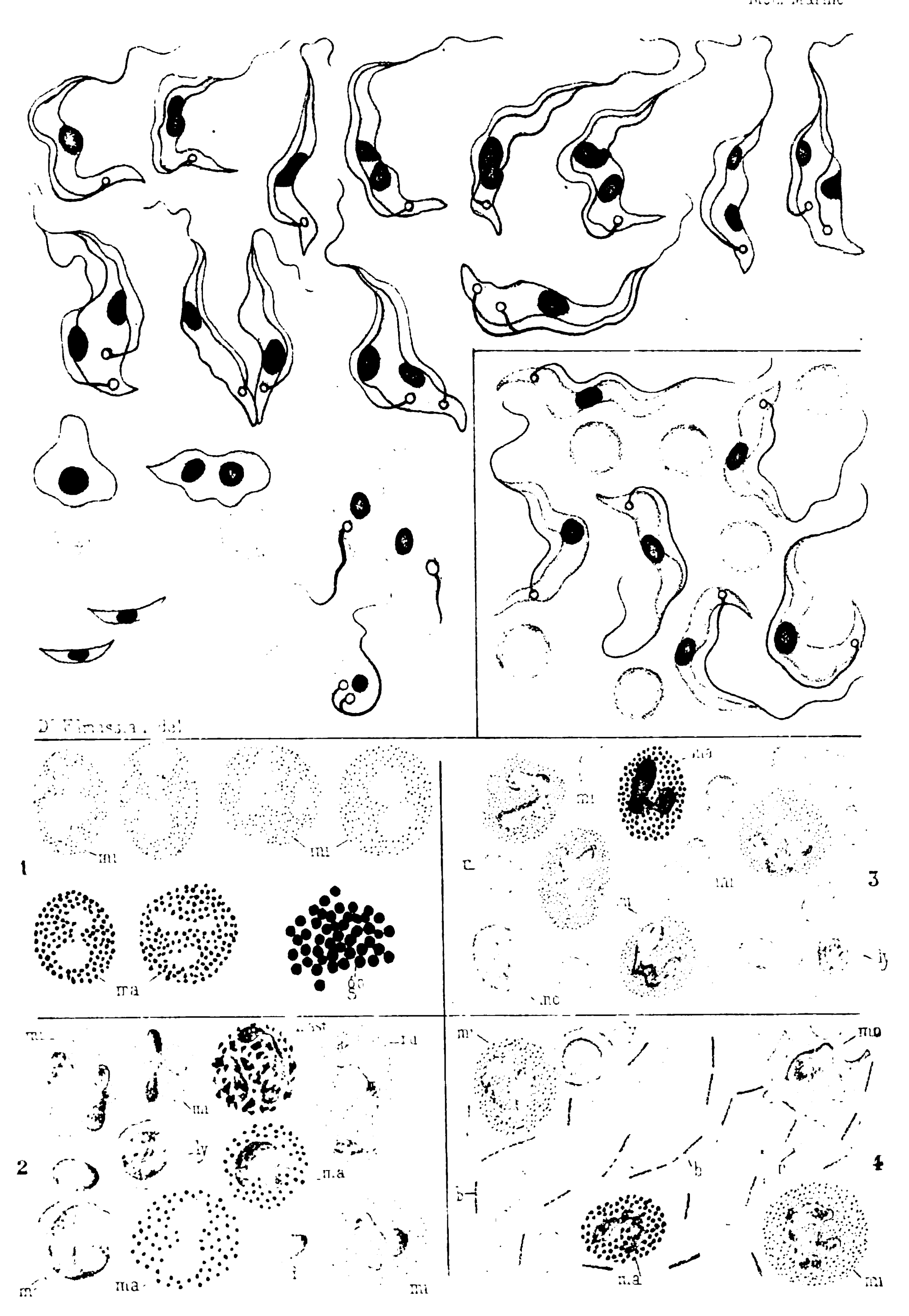
Imp. L. Lafontaine, Paris.



Dr Borrel, del.

V. Roussel, lith.

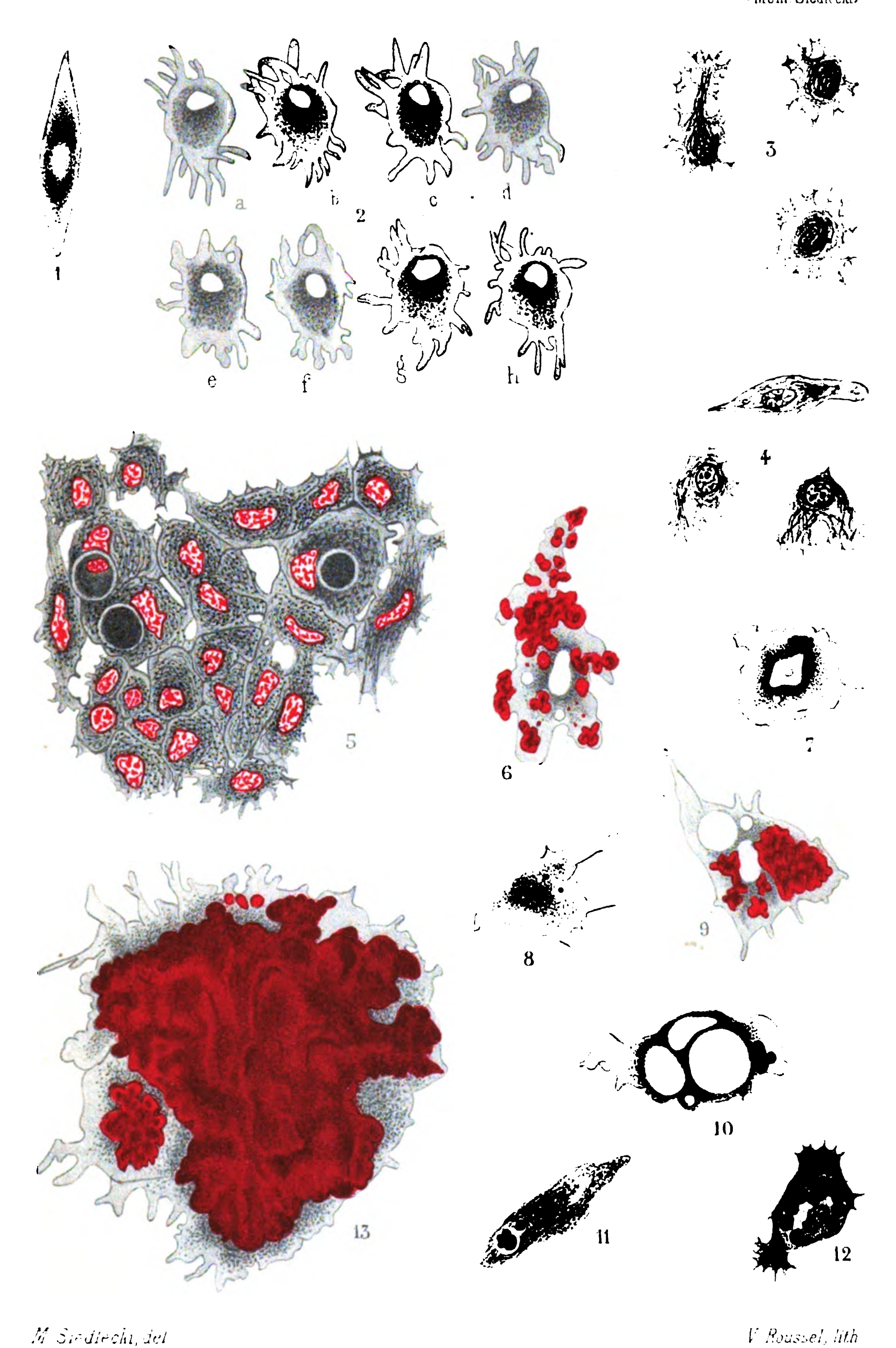
Imp. Lafontaine, Paris.



[illegible] Marino del.

[illegible] lith.

[illegible] Paris



M. Siedlecki, del. V. Roussel, lith.

Imp. L. Lafontaine Paris.



14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

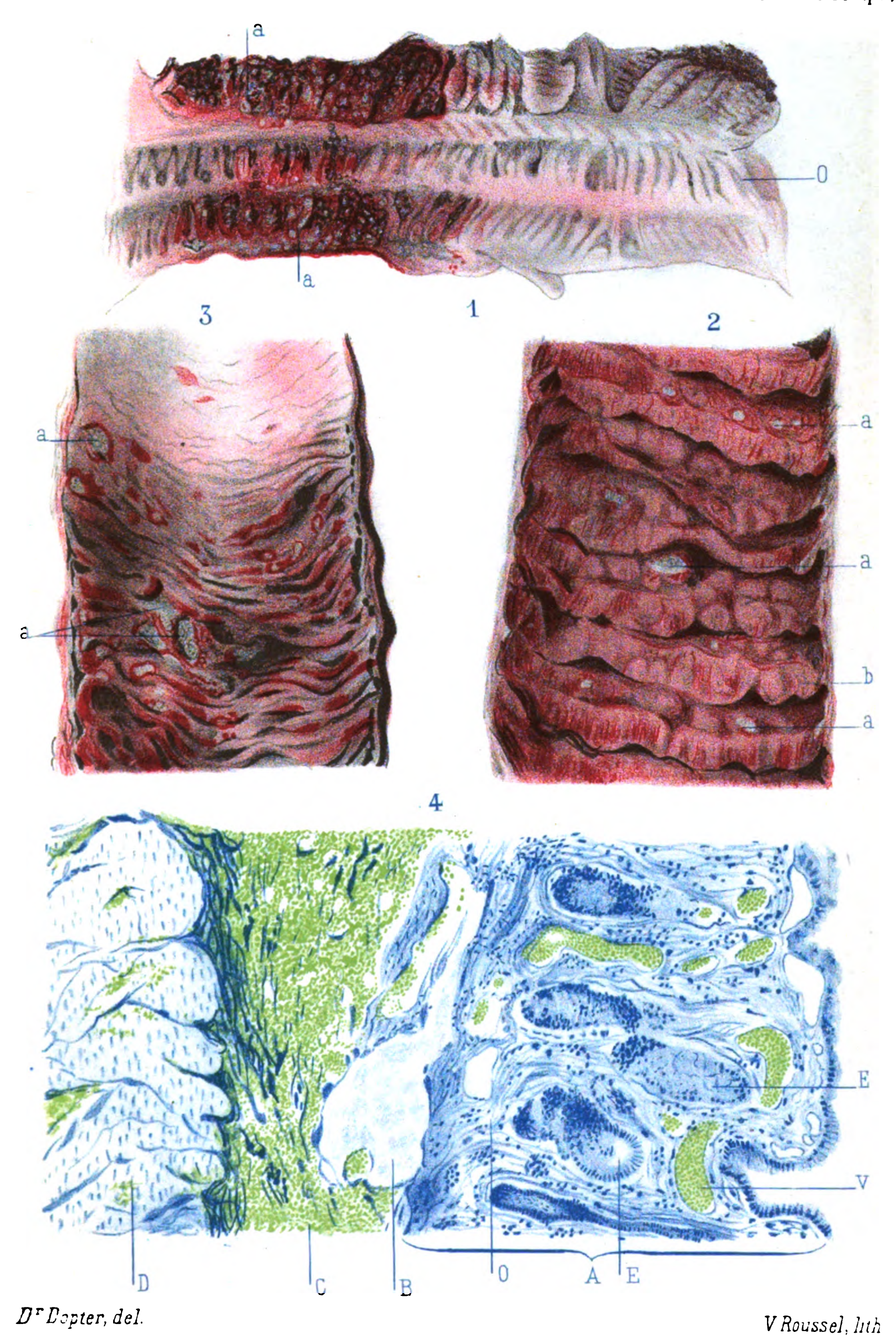
24

25

M. Siedlecki, del.

V. Roussel, lith.

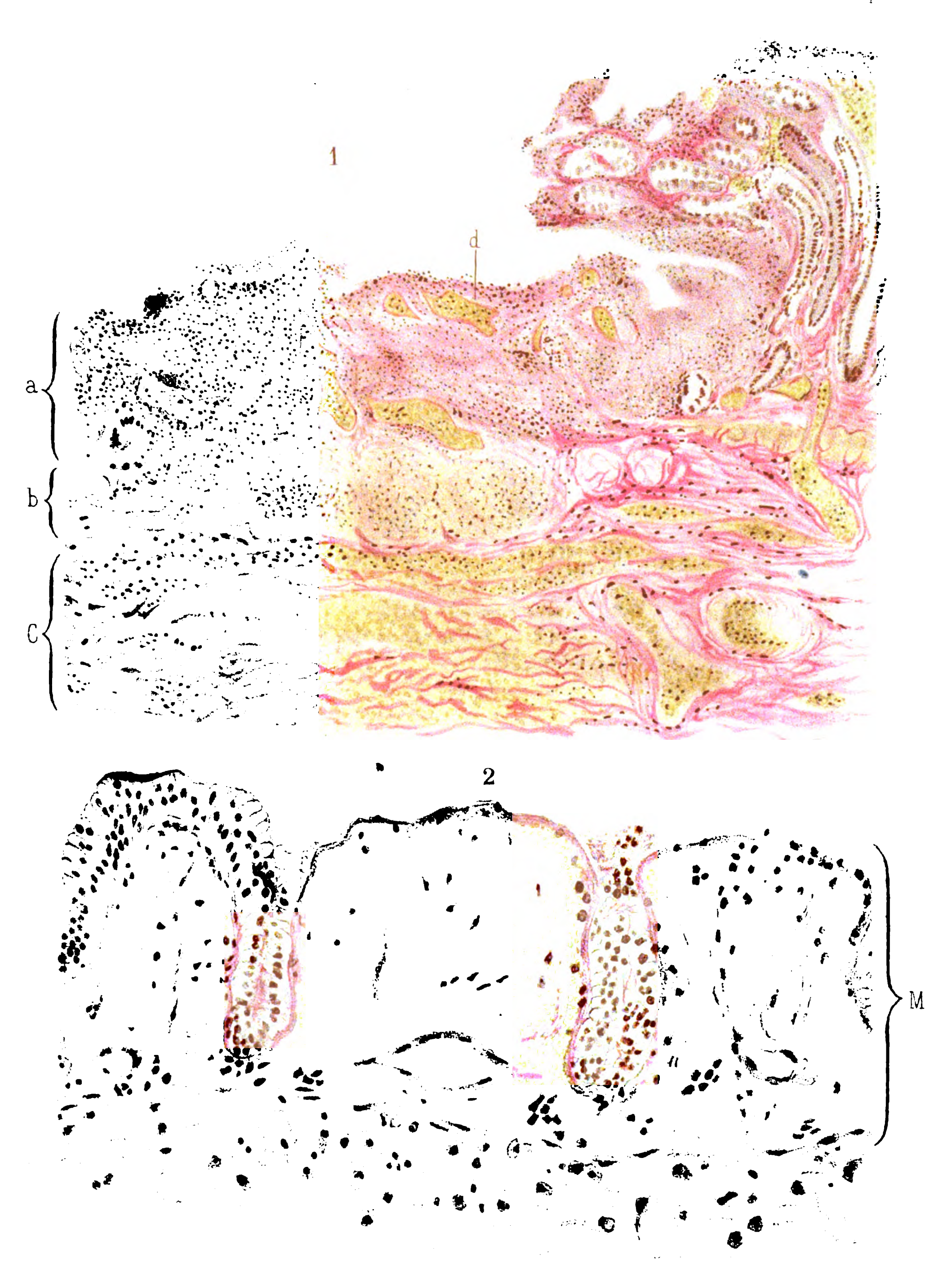
Imp. L. Lafontaine, Paris



Dr Dopter, del.

V Roussel, lith

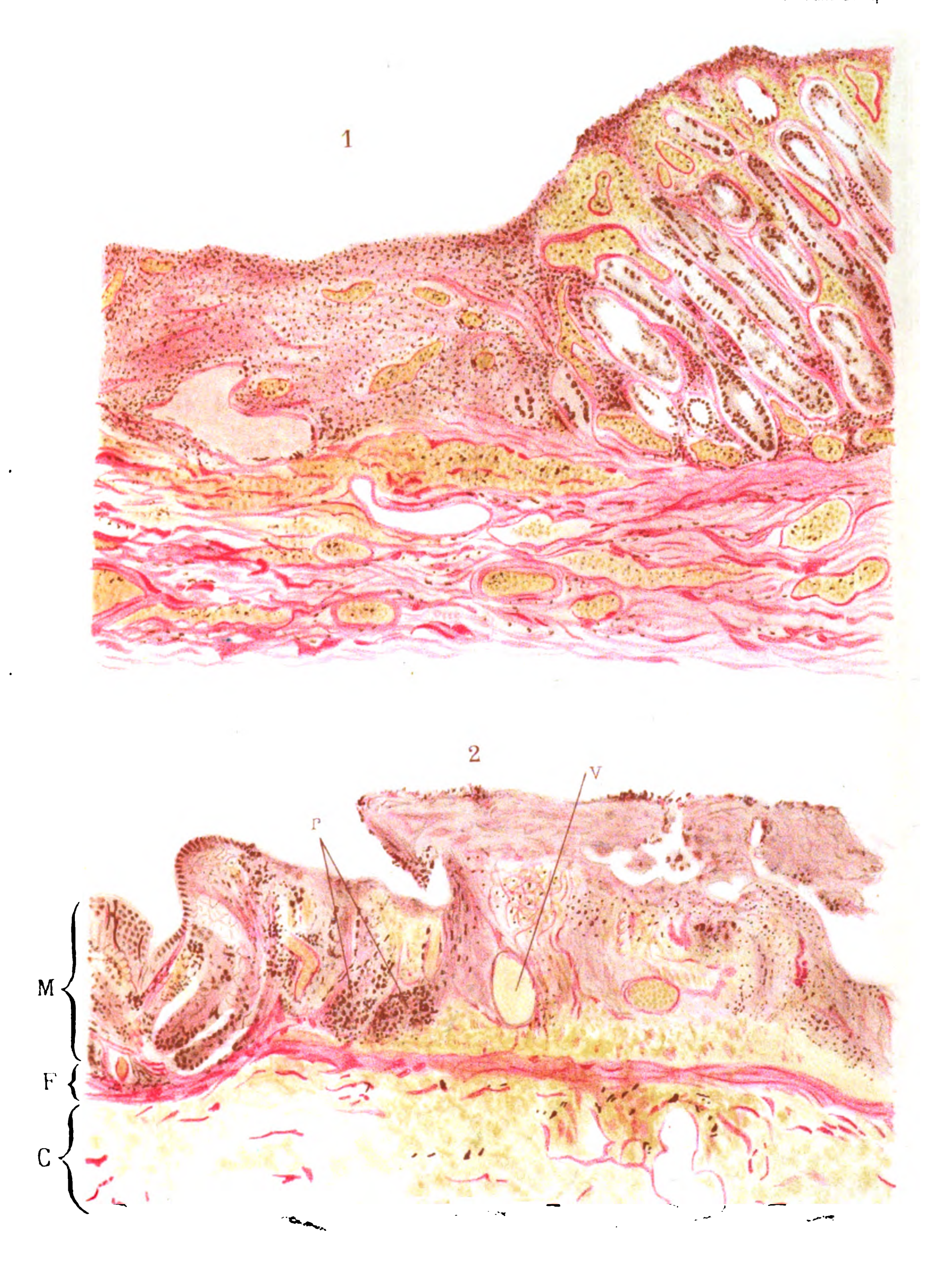
Imp. L. Lafontaine, Paris.



Dr Dopter, del.

V. Roussel. lith.

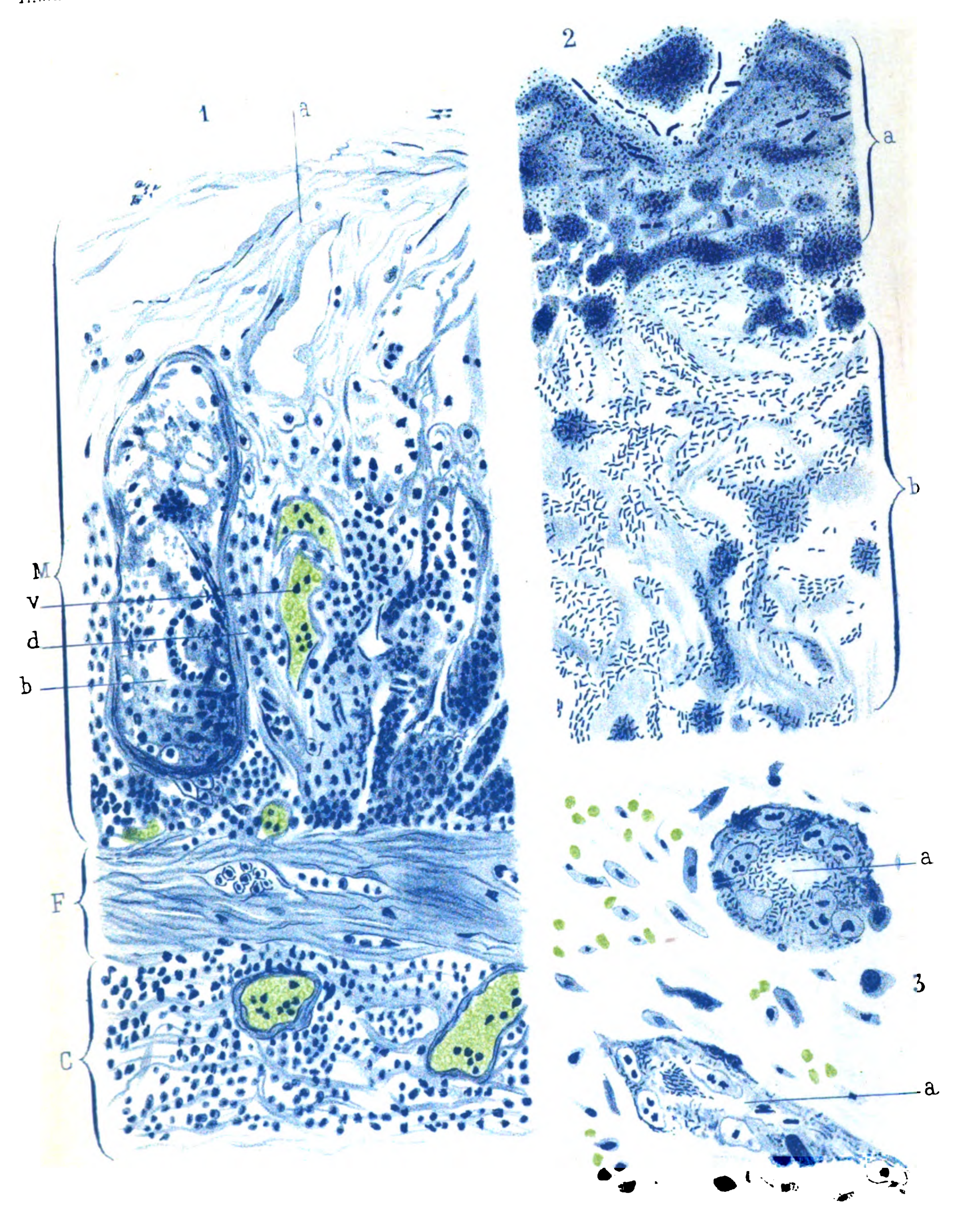
Imp. L. Lafontaine, Paris.



Dr Dopter del.

V. Roussel, lith.

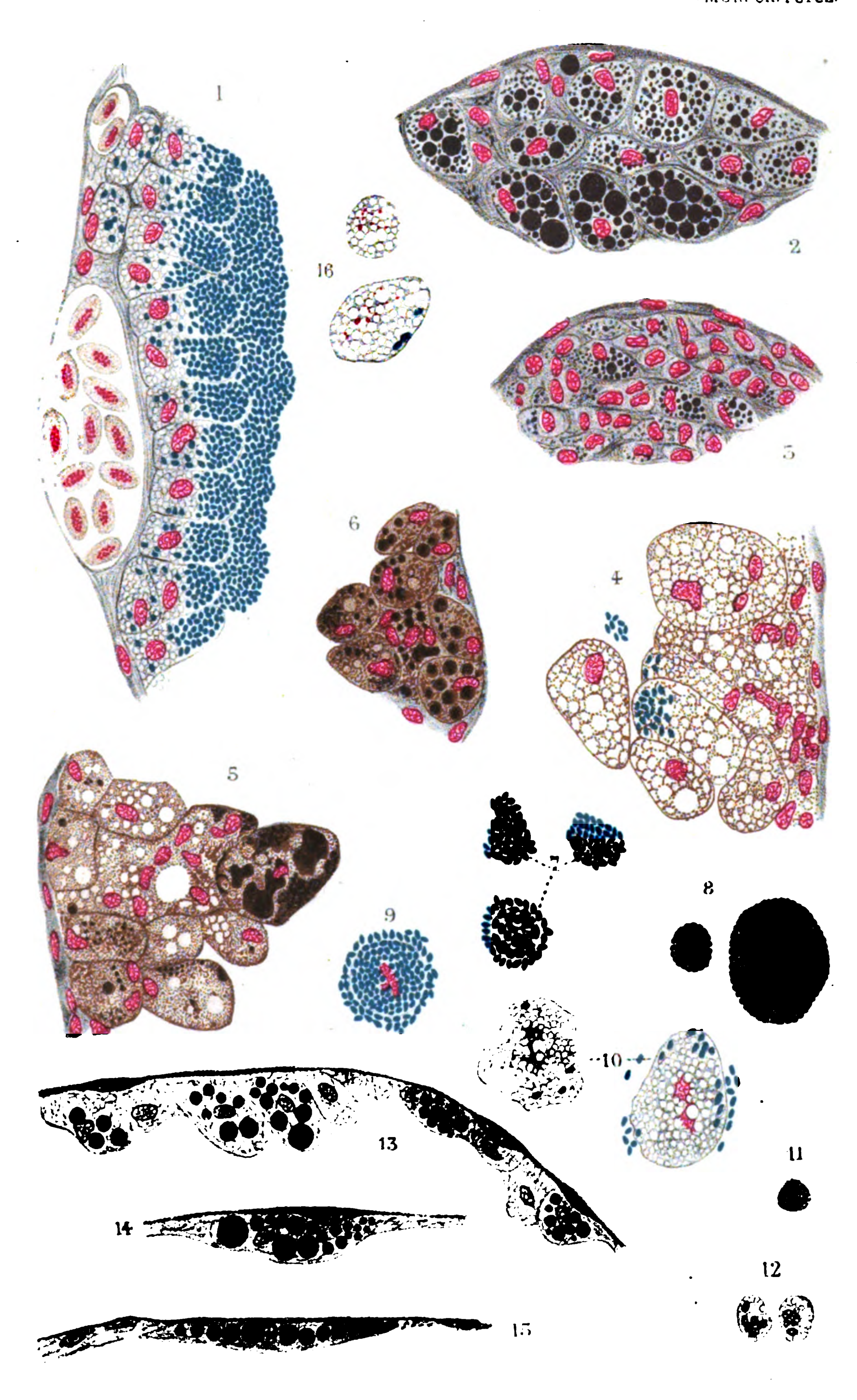
Imp. L. Lafontaine, Paris



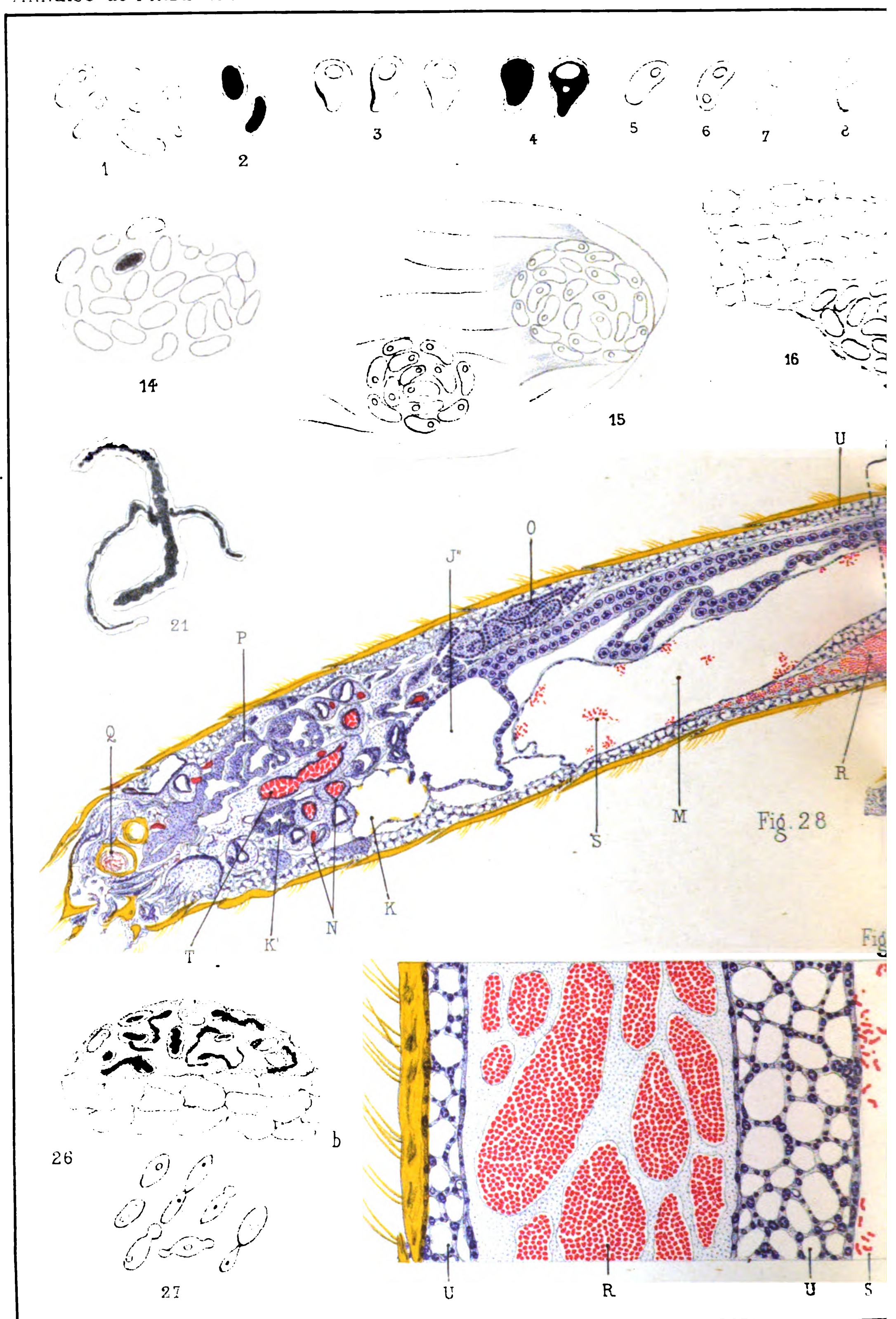
Dr Dopter. del.

Imp. L Lafontaine, Paris

V. Roussel, lith.



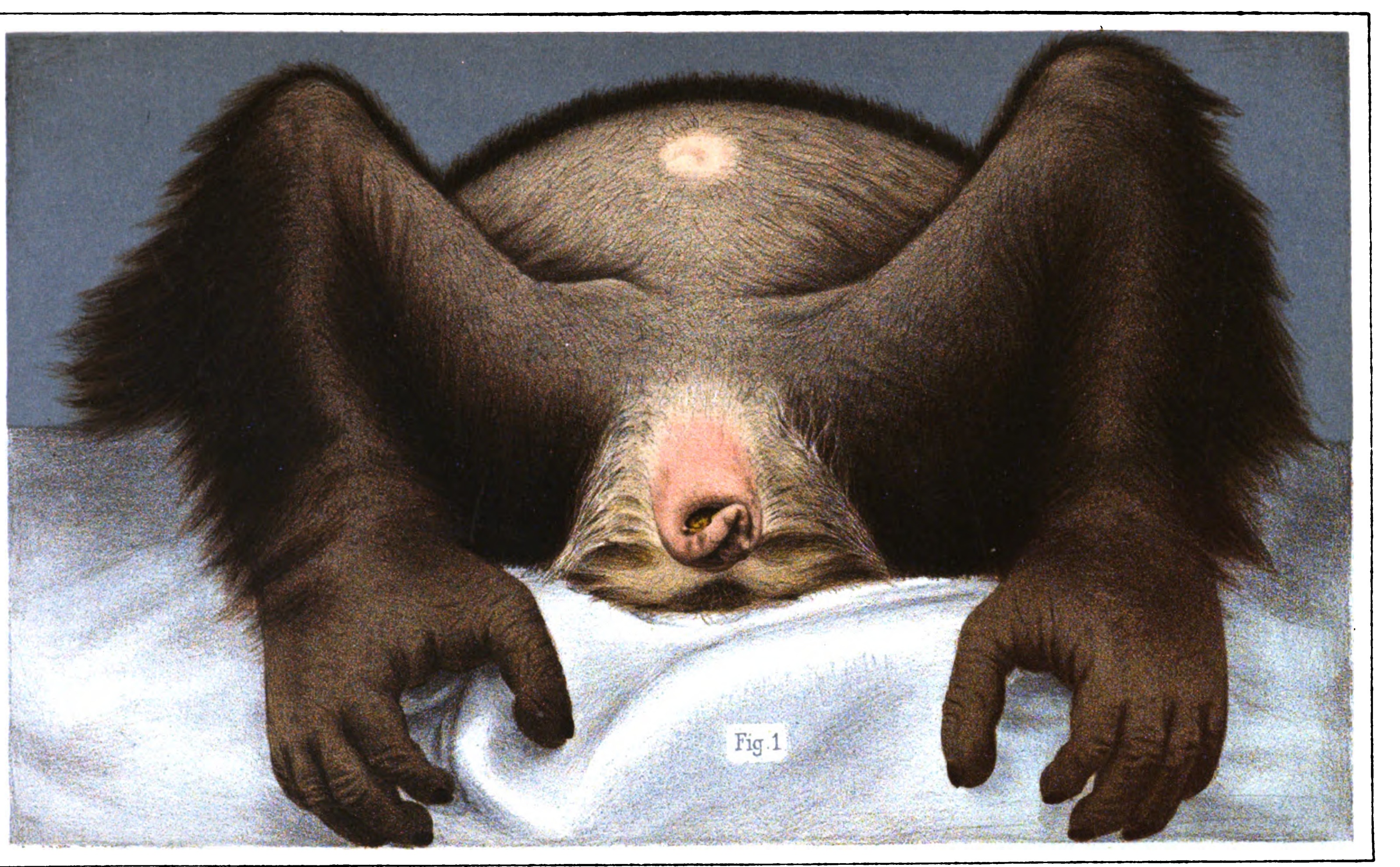
Imp. L. Lafontaine, Paris V. Roussel lith.



Emile Remy, del. & lith.



Imp. L. Lafontaine, Paris



Emile Remy, del. & lith. Imp. L. Lafontaine. Paris

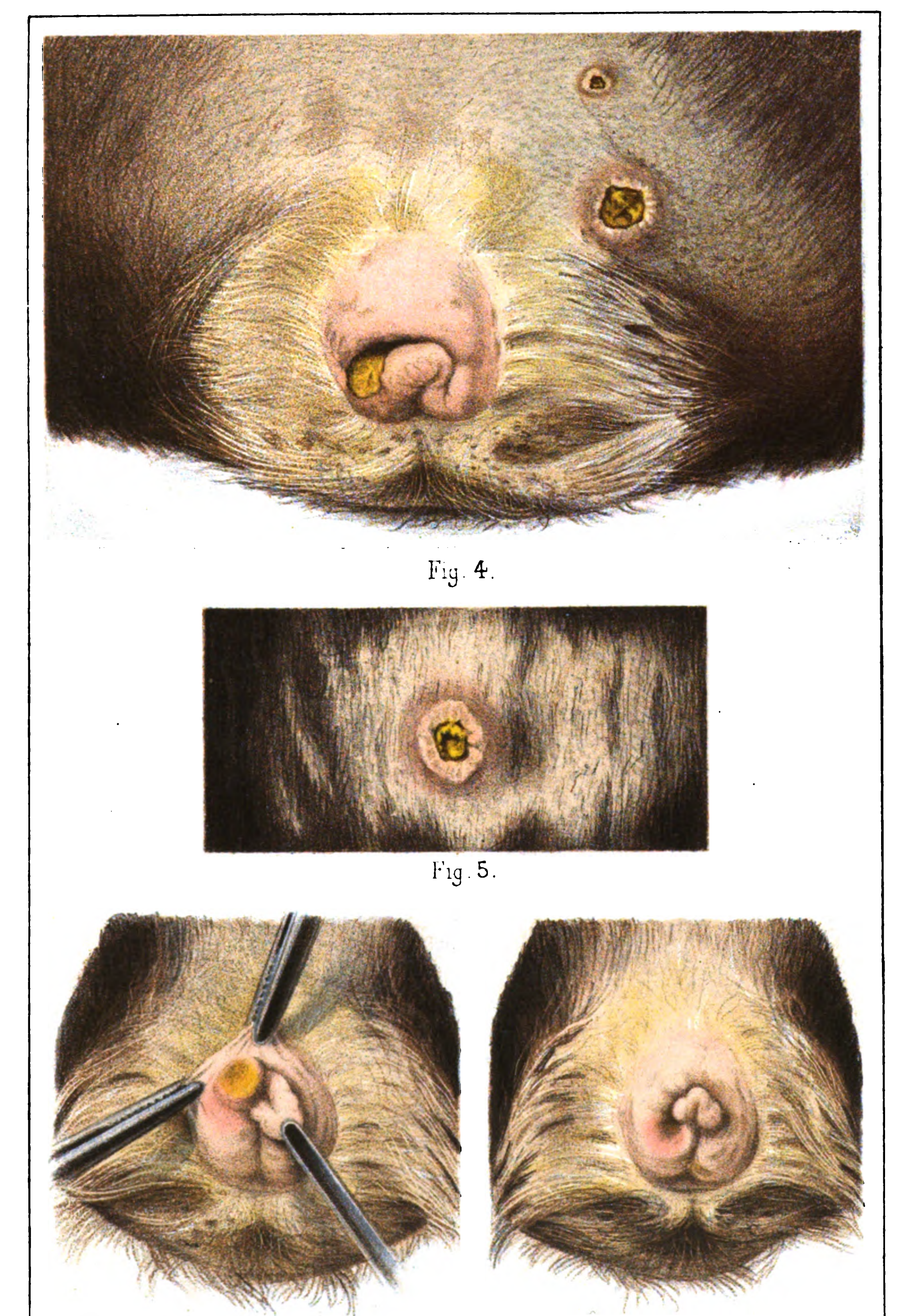


Fig. 4.

Fig. 5.

Fig 3.

Fig 2.



